

DER EINFLUSS DER SPLENEKTOMIE
AUF DAS WACHSTUM DES
AMELANOTISCHEN
HAMSTERMELANOMS A-MEL 3

Peter Mainusch

*Diss
München
1985*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554825_0048

AUS DEM INSTITUT FÜR CHIRURGISCHE FORSCHUNG DER UNIVERSITÄT

MÜNCHEN

(Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c.W. Brendel)

DER EINFLUSS DER SPLENEKTOMIE AUF DAS WACHSTUM DES AMELANOTISCHEN
HAMSTERMELANOMS A-MEL 3

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Peter Mainusch

aus

Murnau

München 1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr.med. Dr.med. vet.C. Hammer

Mitherberichterstatter: Prof. Dr.med. Dr.h.c.W. Brendel

Dekan: Prof. Dr.med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.11.1985

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. MATERIAL UND METHODEN	3
I. MATERIAL	3
1. Tiere	3
2. Tumor	3
II. Methoden	4
1. In vivo Versuche	4
1.1. Hauttransplantation	4
1.2. Tumordinokulation mit unterschiedlichen Zellzahlen	4
a. Technik der Tumordinokulation	5
b. Nachweis eines Tumors	5
1.3. Splenektomie und Tumordinokulation	6
1.4. Transfer von Lymphozyten tumortragender Tiere und Tumordinokulation	8
a. Lymphozytenpräparation	8
b. Versuchsdurchführung	10
2. In vitro Versuche	13
2.1. Immunfluoreszenz	13
a. Prinzip der direkten Immunfluoreszenz	13
b. Präparation der Lymphozyten	13
c. Fluoreszenz-Markierung der Zellen	15
d. Quantitative Bestimmung der B-Lymphozyten, bzw. der antikörpertragenden Tumorzellen	16
2.2. L A I (Leukozyten-Adhärenz-Inhibitionstest)	17
a. Prinzip des L A I	17
b. Antigen- und Leukozytenpräparation	18
2.2.1. Leukozyten-Adhärenz-Inhibitionstest mit der Zählkammermethode	19
2.2.2. Leukozyten-Adhärenz-Inhibitionstest mit der Röhrchenmethode	22

	Seite
2.3. Trypan-Blau-Färbung	24
2.4. Statistische Berechnungen	24
C. E R G E B N I S S E	25
1. In vivo Versuche	25
1.1. Hauttransplantation	25
1.2. Tumordinokulation mit unterschiedlichen Zellzahlen	26
1.3. Splenektomie und Tumordinokulation	28
1.3.1. Gruppe I: Splenektomie und gleichzeitige Inokulation von 5×10^6 A-Mel 3-Zellen	28
1.3.2. Gruppe II: Splenektomie und gleichzeitige Inokulation von 1×10^5 A-Mel 3-Zellen	31
1.3.3. Gruppe III: Splenektomie und gleichzeitige Inokulation von 5×10^3 A-Mel 3-Zellen	34
1.3.4. Gruppe IV: Splenektomie, 14 Tage vor Inokulation von 5×10^3 A-Mel 3-Zellen	39
1.3.5. Gruppe V: Splenektomie, 4 Tage nach Tumordinokulation (5×10^3 A-Mel 3-Zellen)	43
1.4. Transfer von Lymphozyten tumortragender Tiere und gleichzeitige Tumordinokulation	47
2. In vitro Versuche	50
2.1. Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen	50
2.2. L A I (Leukozyten-Adhärenz-Inhibitionstest)	52
2.2.1. Ergebnisse der Zählkammermethode	52
2.2.2. Ergebnisse der Röhrchenmethode	55

	Seite
D. D I S K U S S I O N	58
Tumorwachstum und Immunsystem	58
1. In vivo Versuche	63
1.1. Tumorinokulation mit unterschiedlichen Tumorzellzahlen	63
1.2. Splenektomie und Tumorinokulation mit hoher Tumorzellzahl	63
1.3. Splenektomie und Tumorinokulation mit niedriger Tumorzellzahl	66
1.4. Splenektomie, 14 Tage vor und 4 Tage nach Tumorinokulation	67
1.5. Transfer von Lymphozyten tumortragender Tiere	68
2. In vitro Versuche	70
2.1. Direkte Immunfluoreszenz	70
2.2. Leukozyten-Adhärenz-Inhibitionstest	71
E. Z U S A M M E N F A S S U N G	74
F. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	75

A. EINLEITUNG

Krebs stellt keine einheitliche Krankheit dar, sondern wird als Sammelbegriff für eine große Zahl von Krankheiten angewandt, deren Charakteristikum abnormales und fortgesetztes Wachstum der Zellen eines bestimmten Gewebes ist. Es ist noch wenig über die Faktoren, die zur Krebsentstehung führen und die sein Wachstum induzieren, bekannt. Dafür findet die Rolle, die immunologische Phänomene des Wirtes dabei spielen, immer mehr Beachtung. So ist bereits bekannt, daß bei immunsupprimierten Patienten Tumoren, besonders des lymphoretikulären Systems, häufiger auftreten (21). Der Milz, als größtem lymphatischem Organ, scheint im Verlauf des Tumorstadiums eine besondere Bedeutung zuzukommen. So konnte eine japanische Studie (49) zeigen, daß bei früheren Stadien des Magenkarzinoms Gastrektomie, kombiniert mit Splenektomie, zu einer besseren Prognose führte, als radikale Gastrektomie allein. Dieser "Anti-Tumoreffekt" der Milzexstirpation konnte auch in einem Mäusemodell mit dem Ehrlich-Aszites-Tumor nachgewiesen werden: Orita und Konaga (49) zeigten, daß Splenektomie, abhängig vom Zeitintervall zur Tumoringokulation, zu einer völligen Tumorregression führt, während die Kontrolltiere an dem Tumor starben. Splenektomie könnte die Produktion von Enhancing-Antikörpern, die das Tumorstadium beschleunigen (32) oder die Induktion von Suppressorzellen (23), die ihrerseits die Immunantwort des Wirtes auf den Tumor unterdrücken, verhindern.

Das Phänomen der Begünstigung des Tumorstadiums (Enhancement) wurde schon 1958 von Kaliss (37, 38, 39) beschrieben. Bei allogenen Empfängern führte die Behandlung mit einem gegen den Tumor gerichteten Antiserum (passives Enhancement) oder mit wiederholten Injektionen von antigenem Material des Tumors (aktives Enhancement) zu einem progressiven Wachstum normalerweise abstoßbarer stamm-spezifischer Tumoren.

Wie auf der humoralen Seite die Enhancing-Antikörper, können auf der zellulären Seite die Suppressor-Zellen den Effekt einer Immunreaktion auf Tumor-Antigene unterdrücken (24). Die immunologischen Mechanismen nach Tumorentstehung führen daher nicht nur zur Bildung gegen den Tumor gerichteter Killer-Zellen, sondern auch zu der von Suppressor-Zellen, die ihrerseits den Tumor vor der zytotoxischen Effektorzelle schützen.

Da angenommen werden darf, daß die Milz bei der Generation dieser Zellen und bei der Regulation der komplexen Immunantwort des Wirtes auf einen Tumor einen so bedeutenden Einfluß hat, sollte in vorliegender Arbeit in einem Hamstermodell untersucht werden:

1. Der Einfluß der Splenektomie auf das Tumorwachstum bei unterschiedlicher initialer Tumorbelastung
2. Der Einfluß der Splenektomie auf das Tumorwachstum in Abhängigkeit vom Zeitintervall zwischen Splenektomie und Tumordinokulation
3. Der Nachweis einer gegen den Tumor eingetretenen Sensibilisierung des Wirtes
4. Der Einfluß tumorsensibilisierter Lymphozyten auf das Wachstum des Tumors

B. MATERIAL UND METHODEN

I. MATERIAL

1. Tiere

Die folgenden Untersuchungen wurden an ausgezüchteten erwachsenen syrischen Goldhamstern (*Mesocricetus auratus*) durchgeführt. Zucht und Aufzucht der Versuchstiere erfolgte im zentralen Tierlabor des Instituts. Die Hamster wurden in Makrolonkäfigen Typ II in Barrierenhaltung auf behandeltem Sägemehl als Einstreu gehalten. Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit waren geregelt (22°C bzw. $55 \pm 5\%$ relative Luftfeuchte). Es bestand Kunstlichtbeleuchtung im 12h/12h Rhythmus. Wasser (unbehandeltes Leitungswasser) und Futter (20 mm Pellets Altromin Standarddiät*) wurden ad libitum angeboten. Der Keimstatus der Tiere wurde nicht spezifiziert.

2. Tumor

1957 entdeckte Fortner (17) erstmals spontan auftretende Tumoren bei Hamstern. Die histologischen Befunde und das biologische Verhalten der Neoplasien entsprach menschlichen Melanomen (51). In den Tumoren beobachtete Fortner nichtpigmentierte Bezirke, die sich noch anaplastischer als die melaninhaltigen Tumorzellen verhielten. Die spontan aufgetretenen Melanome ließen sich auf Hamster transplantieren. 1958 konnte Fortner zwei transplantable Melanomzelllinien etablieren: Das melanotische Melanom Nr. 1 und das amelanotische Melanom Nr. 3 (A-Mel 3).

Die folgenden Experimente wurden mit dem A-Mel 3 durchgeführt. Die A-Mel 3-Zellen wurden in vitro in Langzeitkulturen geführt.

*) Firma Altrogge Spezialfutterwerk GmbH

II. METHODEN

1. In vivo Versuche

1.1. Hauttransplantation

Zur Orientierung über den Grad an Histokompatibilität der aus einem Zuchtpaar über 7 Jahre ausgezüchteten Hamsterpopulation wurde das Verhalten von isogenen Hauttransplantaten untersucht. Zehn männlichen Hamstern wurde je ein isogenes und als Kontrolle ein autologes Hautstück mittels Histoacrylkleber* auf den Rücken transplantiert. Die Transplantate hatten einen Durchmesser von ca. 1 cm und wurden aus der enthaarten** Rückenhaut des Spenders herausgestanzt. Die Spenderhaut wurde auf den ebenfalls enthaarten Rücken des Empfängers übertragen. Als Kontrolle wurde ein gleich großes autologes Hautstück des Empfängers von der linken auf die rechte Rückenpartie transplantiert. Jedes Versuchstier besaß also zwei Transplantate: Links das isogene und rechts als Kontrolle das autologe Hautstück. Beide Transplantate wurden mit einem Drahtgitter geschützt und fortlaufend kontrolliert.

1.2. Tumorinokulation mit unterschiedlichen Zellzahlen

Um die Angehrate und den zeitlichen Verlauf des Wachstums des A-Mel 3-Melanoms in Abhängigkeit von der inokulierten Tumorzellzahl zu untersuchen, wurden auf je 5 Hamster Einzelzellsuspensionen von 1×10^3 , 1×10^4 und 1×10^5 A-Mel 3 Zellen inokuliert.

* Histoacryl blau, Gewebekleber B. Braun Melsungen AG

** Pilca Enthaarungscreme, Fa. Olivin, Hamburg

a) Technik der Tumorinokulation

Die aus Kulturflaschen entnommenen A-Mel 3 Zellen wurden 3x bei 275xg über 5 min. in Hank'scher Lösung* gewaschen. Die Zählung der Zellen erfolgte in Neubauer-Zählkammern. Mit der Trypanblau-Färbung wurden die Zellen auf ihre Vitalität getestet. Die gewünschte Zellzahl wurde in 0,25 ml Hank'scher Lösung eingestellt.

Den Versuchstieren wurden immer Einzelzellsuspensionen des A-Mel 3 Melanoms subcutan (s.c.) in die Rückenpartie inokuliert. Die Inokulationsstelle wurde mit Pilca enthaart und mit Kodan Tinktur** desinfiziert, um erstens eine exakte subcutane Injektion zu gewährleisten und zweitens das Auftreten eines Tumors genau bestimmen zu können.

b) Nachweis eines Tumors

Ein Tumor galt dann als aufgetreten, wenn er palpabel war. Durch Palpation konnten auch sehr kleine Tumoren ($\varnothing < 0,1$ cm) entdeckt werden, da die gut verschiebbliche Haut der Rückenpartie der Hamster es erlaubt, die Inokulationsstelle zwischen den Fingern zu rollen und so auch kleinste Resistenzen festzustellen.

Die Tumorinokulation und die tägliche Kontrolle der Tiere erfolgte in kurzer Äthernarkose.

* Apotheke, Universitätsklinik München

** Kodan Tinktur farblos, Fa. Schülke und Mayr

1.3. Splenektomie und Tumorinokulation

Bei männlichen Tieren wurde in Chloralhydrat*-Narkose (25 mg/100 g KG intraperitoneal) unter aseptischen Bedingungen nach medianer Laparotomie mit Hilfe eines bipolaren Kauters Arteria und Vena lienalis und ihre Äste koaguliert und die Milz in toto exstirpiert. Das Abdomen wurde mit Einzelnähten** verschlossen. Entsprechende Kontrolltiere wurden scheinoperiert.

Die Hamster atmeten während der Operation spontan. Die Operationswunden heilten per primam.

Die Splenektomie(Sx), bzw. Scheinoperation (Ko) erfolgte, wie oben beschrieben, gleichzeitig, 14 Tage vor oder 4 Tage nach der Tumorinokulation.

* Apotheke, Universitätsklinik München

** 4/0 Ethiflex, Fa. Ethicon

Tab. 1: Versuchsgruppen

Gruppe	n	Tu-Zellzahl	Zeitpunkt der Splenektomie	Versuchsende (d nach Tu-Inokulation)	
I	Sx	7	5×10^6	gleichzeitig	8
	Ko	8	5×10^6	"	8
II	Sx	7	1×10^5	"	11
	Ko	7	1×10^5	"	11
III	Sx	10	5×10^3	"	16
	Ko	10	5×10^3	"	16
IV	Sx	10	5×10^3	14 Tage vor Tu-Inokulation	20
	Ko	13	5×10^3	"	20
V	Sx	10	5×10^3	4 Tage nach Tu-Inokulation	21
	Ko	10	5×10^3	"	21

Die Versuchstiere wurden täglich in kurzer Äthernarkose kontrolliert und das Körpergewicht bestimmt. Die Inokulationsstelle wurde hinsichtlich des Auftretens eines Tumors palpiert und die Ausmaße mit der Schublehre gemessen.

Bevor die Tumoren eine Größe erreichten, bei der sie erfahrungsgemäß ulzerierten und damit über eine Infektion zum Tod der Tiere führten, wurde der Versuch abgebrochen. Das Tumornaßgewicht wurde bestimmt. Für weitere immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden Milz, Thymus, Lymphknoten, peripheres Blut und eine Probe des Tumors steril entnommen.

1.4. Transfer von Lymphozyten tumortragender Tiere und Tumorinokulation

Je 21 männliche und 19 weibliche Hamster erhielten je 4×10^5 A-Mel 3 Zellen s.c. in die Rückenpartie inokuliert. Nach 5 Tagen wurde die Hälfte der Tiere durch Herzpunktion entblutet. Das Blut, Lymphknoten und die Milz wurden steril entnommen. Das Blut wurde mit Thrombophob * ungerinnbar gemacht. Aus den Organen wurden Lymphozytensuspensionen hergestellt.

a) Lymphozytenpräparation

Lymphknoten:

Die Lymphknoten wurden mit Hilfe eines Durchlichtmikroskopes (8-fache Vergrößerung, Fa. Leitz) von dem sie umgebenden Fettgewebe freipräpariert und mechanisch suspendiert.

* Thrombophob, Nordmark-Werke GmbH

Milz:

Die steril entnommene Milz wurde in Hank'scher Lösung mechanisch über einem Metallgitter zerkleinert. Die so gewonnenen Einzelzellen, mit einem hohen Anteil an Erythrozyten, wurden suspendiert. In einem zweiten Schritt wurden die Milzlymphozyten von den Erythrozyten aufgrund der verschiedenen Dichte von Lymphozyten separiert. Die Milz-Zellsuspensionen wurden vorsichtig über 3 ml Ficoll-Isopaque-Gradienten (Ficoll $d = 1,077$)* geschichtet und 15 min. bei 1500xg zentrifugiert. Die Lymphozyten reichern sich selektiv aufgrund ihrer geringeren Dichte an der Trennschicht Hank'scher Lösung-Ficoll an. Die Erythrozyten agglutinieren und wurden abzentrifugiert. Der Lymphozytenring wurde mit Pasteurpipetten abpipettiert und in Hank'scher Lösung suspendiert.

Blut:

Die Präparation der Lymphozyten aus dem Blut erfolgte analog der Separation der Milzlymphozyten mit dem Ficoll-Isopaque-Gradienten ($d = 1,077$). Auch die Lymphozyten aus dem Blut wurden in Hank'scher Lösung suspendiert.

Die so gewonnenen Lymphozytensuspensionen aus Lymphknoten, Milz und Blut wurden 3 x bei 275xg in Hank'scher Lösung gewaschen und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellen wurden auf 1×10^7 Lymphozyten pro 0,2 ml Hank'scher Lösung eingestellt.

* Apotheke, Universitätsklinik München

b) Versuchsdurchführung

Die so angereicherte Lymphozytenpräparation (1×10^7 Lymphozyten) eines mit dem Tumor inokulierten Tieres wurde einem unbehandelten gleichgeschlechtlichen Hamster intraperitoneal (i.p.) injiziert. Entsprechende Kontrolltiere erhielten 0,2 ml Hank'sche Lösung i.p.. Gleichzeitig wurde beiden Gruppen 5×10^3 A-Mel 3 Zellen in 0,25 ml Hank'scher Lösung in die Rückenpartie appliziert. Der Versuch wurde mit der verbleibenden Hälfte der Tiere 12 Tage nach nach Tumorinokulation analog durchgeführt.

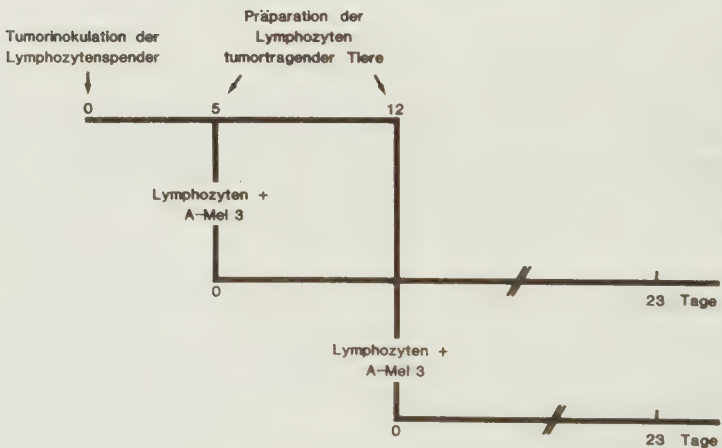


Abb. 1: Versuchsschema, Transfer sensibilisierter Lymphozyten

Tab. 2: Gruppeneinteilung:

	n	A-Mel 3	Lymphozyten
Lymphozyten, 5 Tage nach Tumorgabe	11 ♂	5×10^3	1×10^7
Kontrollen	9 ♀	5×10^3	1×10^7
	5	5×10^3	----
Lymphozyten, 12 Tage nach Tumorgabe	11 ♂	5×10^3	1×10^7
Kontrollen	9 ♀	5×10^3	1×10^7
	5	5×10^3	----

Das Tumorwachstum bei den Versuchstieren wurde täglich unter kurzer Äthernarkose kontrolliert. 23 Tage nach Lymphozyten-transfer und Tumorinokulation wurden die Tiere getötet.

Ein zweites Experiment wurde analog durchgeführt. Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Versuch wurde die Lymphozytenpräparation jedoch 4 und 10 Tage nach Tumorinokulation der Spendertiere auf die Tumorempfänger transferiert. Die Dosierung sowohl der Lymphozyten, als auch der A-Mel 3-Zellen war identisch.

Tab. 3: Gruppeneinteilung:

	n	A-Mel 3	Lymphozyten
Lymphozyten, 4 Tage nach Tumorgabe	11♀	5×10^3	1×10^7
Kontrollen	11♀	5×10^3	----
Lymphozyten, 10 Tage nach Tumorgabe	11♀	5×10^3	1×10^7
Kontrollen	11♀	5×10^3	----

2. In vitro Versuche

2.1. Immunfluoreszenz

Mit der direkten Immunfluoreszenztechnik sollte quantitativ der Anteil von B-Lymphozyten in Milz, Thymus, Lymphknoten und peripherem Blut bestimmt werden. Weiterhin sollten auf der Zellmembran der A-Mel 3 Melanome Antikörper nachgewiesen werden.

a) Prinzip der direkten Immunfluoreszenz:

Die Technik der Immunfluoreszenz beruht auf dem Prinzip der Antigen-Antikörperreaktion. Dabei wird der spezifische Antikörper mit der fluoreszierenden Verbindung (Fluoreszin-isothiocyanat = FITC oder Rhodamin) markiert und damit die zu untersuchende Zellsuspension inkubiert. Zellen mit dem spezifischen Antigen binden den FITC-markierten Antikörper. In einem zweiten Schritt wird die Suspension gewaschen, um nichtgebundenen, überschüssigen markierten Antikörper zu entfernen. Die antikörperhaltigen Zellen fluoreszieren, wenn sie UV-Licht geeigneter Wellenlänge ausgesetzt werden.

Da nur B-Lymphozyten IgG produzieren, können sie aufgrund dieser Eigenschaft mit Anti-IgG-Antikörpern identifiziert werden.

b) Präparation der Lymphozyten:

Bei Versuchsende wurden von den splenektomierten, bzw. scheinoperierten Tieren Milz, Thymus, der zum Tumor ipsilaterale und kontralaterale axilläre, die inguinalen, poplitealen und paraaortalen Lymphknoten und eine Probe des Tumors steril entnommen. Das ebenfalls abgenommene Blut wurde heparinisiert. Aus diesen Organen wurden Zellsuspensionen wie folgt hergestellt.

Milz:

Das Milzparenchym wurde aus der Organkapsel mit einem Skalpell ausgestrichen. Durch weitere mechanische Zerkleinerung gelang es, die Milzzellen in Hank'scher Lösung zu suspendieren. Die Separation der Lymphozyten von den Erythrozyten erfolgte mittels Dichtezentrifugation mit dem Ficoll-Isopaque Gradienten, wie bereits beschrieben.

Thymus:

Aus der Suspension von Thymozyten, die durch mechanische Zerkleinerung mittels Kanülen gewonnen wurde, war eine Eliminierung von Erythrozyten nicht notwendig, da die Thymuspräparation weitgehend erythrozytenfrei war.

Lymphknoten:

Die Lymphknoten wurden unter dem Lichtmikroskop (8-fache Vergrößerung, Firma Leitz) aus dem umgebenden Fettgewebe isoliert. Anschließend wurde ihre Bindegewebskapsel eröffnet und die Lymphozyten in Hank'scher Lösung mit Kanülen ausgestrichen.

Blut:

Das heparinisierte Blut wurde 1:1 mit Hank'scher Lösung verdünnt. Die Separation der Lymphozyten erfolgte analog der Milzpräparation mit Ficoll-Isopaque ($d = 1,077$).

Tumor:

Aus einer Probe des Tumors wurden Zellen mechanisch in Suspension gebracht. Der solide Tumor wurde in kleine Proben geschnitten und mit dem Skalpell über ein Drahtgitter ausgestrichen.

c) Fluoreszenz-Markierung der Zellen

Die Lymphozyten- und die Tumorzellsuspensionen wurden in Plastik-Reagenzröhrchen mit 7 mm Durchmesser pipettiert und 5 min. in Hank'scher Lösung bei 275xg zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Wasserstrahlpumpe entfernt. Das Pellet wurde erneut in Hank'scher Lösung resuspendiert und gewaschen. Die Zellen wurden in der Neubauerzählkammer gezählt und auf 1×10^6 pro Probe eingestellt. Um diese Zellproben zu konzentrieren, wurden sie 3 min. bei 100xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu diesem Pellet wurde ein Tropfen 1:11 verdünntes, mit FITC markiertes anti-Hamster IgG* zugetropft und mit einem automatischen Schüttler kurz gemischt. Anschließend wurden die Proben 30 min. bei 20° C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in Hank'scher Lösung, um überschüssiges, nicht gebundenes

* IgG Fraktion Goat, Anti-Hamsterserum (Fluorescein conjugated)
Cappel Laboratories/Downingtown USA

FITC markiertes anti-Hamster IgG zu entfernen, wurden die Pellets mit einem Tropfen Glycerin/NaCl (1:1) aufgenommen und auf Objektträger pipettiert. Diese wurden mit Deckgläschen 24x24 mm bedeckt und in einer feuchten Kammer bei 4° C bis zum Ablesen, maximal jedoch vier Stunden, gehalten.

d) Quantitative Bestimmung der B-Lymphozyten, bzw. der antikörpertragenden Tumorzellen

Die Fluoreszenz wurde an 100 Zellen unter einem Zeiss-Universal-Fotomikroskop im Durchlicht abgelesen. Als Beleuchtungsquelle diente eine Halogenleuchte 12V 100 W, für die Exitation wurde ein KP 500 Kurzpaßfilter und ein BG 38 Rotfilter herangezogen.

Das Dunkelfeld wurde mit einem Ölinversionskondensor erzeugt. Abgelesen wurde bei vierzigfacher Vergrößerung mit einem Neofluor 40,0,75160/0,17 bzw. mit einem Planneofluoar 25,0,8 W-Öl.

Mit dieser Kombination erhält man eine leuchtend apfelgrüne Fluoreszenz bei rotem Zytoplasma, während der Hintergrund dunkel erscheint.

Die Anzahl der FITC-markierten Zellen, die pro 100 ausgezählter Zellen auftreten, entspricht dann dem Prozentsatz der B-Lymphozyten an der Gesamtlmphozytenpopulation, bzw. dem Prozentsatz antikörpertragender Tumorzellen.

2.2. L A I (Leukozyten-Adhärenz-Inhibitionstest)

a) Prinzip des L A I

Bestimmte mononukleäre Zellen, wie z.B. Leukozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten besitzen die Fähigkeit zur Adhärenz an Glasoberflächen. Werden diese Leukozyten von Karzinompatienten jedoch mit einem Antigenextrakt ihres spezifischen Tumors in vitro inkubiert, reduziert sich der Anteil der zur Adhärenz befähigten Zellen. Dabei reagieren nur gegen das Tumorantigen sensibilisierte Leukozyten direkt mit dem Tumorantigen und verlieren durch diese Reaktion ihre Glasadhärenz. Der Test stellt eine empfindliche Methode dar, zellgebundene Anti-Tumorimmunität nachzuweisen und scheint immunologisch spezifisch zu sein.

Der Test wurde mit A-Mel 3-Hamstern, bzw. Kontrolltieren durchgeführt. Getestet wurden die Leukozyten aus dem Blut und die Lymphozyten aus der Milz. Die Zellen von je 5 Hamstern, 7 Tage nach Tumorinduktion entnommen, bzw. 5 Kontrollen, wurden gepoolt, um für die Testansätze genügend hohe Zellzahlen zu erhalten. Als spezifisches Antigen diente ein NaCl-Extrakt aus A-Mel 3-Melanom.

b) Antigen- und Leukozytenpräparation

Tumorantigen:

Es wurde A-Mel 3 Tumorgewebe, das bei -20°C gelagert war, verwendet. 1-5g des Gewebes wurden über ein Drahtnetz homogenisiert und in PBS ($\text{pH}=7,3$) unter Kühlung mit Eiswasser gepottert. Das Homogenat wurde bei 4°C , $1000\times g$ für 30 min., und der Überstand anschließend noch einmal bei $20.000\times g$ für 30 min. zentrifugiert. Der Gesamteiweißgehalt des löslichen Antigenextraktes, der als klarer Überstand zurückbleibt, wurde mit der Biuretmethode bestimmt und durch Verdünnen mit PBS auf $10\text{ mg\%}$ eingestellt. Der Extrakt wurde in Portionen zu $0,1\text{ ml}$ eingefroren.

Präparation von Lymphozyten aus der Milz:

Aus den steril entnommenen Milzen wurden, wie schon beschrieben, Einzelzellsuspensionen in Hank'scher Lösung hergestellt. 1 ml wurde 1:10 mit Dextran (MG 250000) für eine Stunde in einem 37°C warmen Wasserbad in Glaszentrifugenröhrchen inkubiert, um eine möglichst vollständige Sedimentation der in den Suspensionen enthaltenen Erythrozyten zu erreichen. Der Überstand mit dem lymphozytenreichen Hank'scher Lösung/Dextran-Gemisch wurde in Plastikröhrchen überführt und 5 min. bei $200\times g$ bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Lymphozyten im Pellet wurden mit Medium TC 199, versetzt mit 10% fetalem Kälberserum, $8,8\%$ Natriumbikarbonat und Penicillin/Streptomycin, resuspendiert, zweimal gewaschen (5 min. bei $200\times g$) und auf 2×10^7 Zellen/ml Medium eingestellt.

Präparation von Leukozyten aus peripherem Blut:

Heparinisiertes Blut wurde in Glasgefäßen aufgenommen und bei 37° C für 30 min. inkubiert, um eine Sedimentation der Erythrozyten zu erreichen. Da dadurch keine vollständige Sedimentation erfolgte, wurde das leukozytenreiche Plasma mit den verbleibenden Erythrozyten 1:10 mit Dextran (MG 250000) versetzt und, wie oben beschrieben, inkubiert. Anschließend wurde der Überstand mit dem leukozytenreichen Plasma/Dextran-Gemisch in Plastikröhrchen überführt. Nach Zentrifugation (5 min. bei 200xg) bei Raumtemperatur wurde das Pellet in 1 ml eines Gemisches aus H₂O dest. und 0,9 % NaCl im Verhältnis 2:1 aufgenommen. Nach 10 sec. wurde die osmotische Reaktion durch Zugabe von 4 ml Medium TC 199 gestoppt. Auf diese Weise gelang es, die Leukozytenpräparation noch kontaminierenden Erythrozyten zu lysieren. Die Zellen wurden dann zweimal gewaschen und in einer Konzentration von 2×10^7 /ml in Medium TC 199 resuspendiert.

2.2.1. Leukozyten-Adhärenz-Inhibitionstest mit der Zählkammermethode

Der L A I wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden durchgeführt. Mit der Zählkammermethode wurde der Prozentsatz adhärenter Zellen bestimmt, mit der Röhrchenmethode der Prozentsatz nichtadhärenter Zellen.

Zählkammermethode:

Testansatz:

Je 0,05 ml der Lymphozyten- oder Leukozytensuspension ($=1 \times 10^6$ Zellen) und 0,05 ml einer 1:5 Verdünnung des Tumorextraktes oder als Leerwert 0,05 ml PBS wurde mit Micropipetten in Plastikröhrchen gemischt. Das Endvolumen betrug nach Auffüllen mit Medium 0,2 ml.

Tab. 4: Testansatz, Zählkammermethode des L A I

	Probe	Leerwert
Zellsuspension	0,05 ml	0,05 ml
Tumorantigen	0,05 ml	-----
PBS	-----	0,05 ml
Medium TC 199	0,10 ml	0,10 ml

Die Röhrchen wurden mit Parafilm verschlossen und bei 37° C im Wasserbad für 30 min. automatisch geschüttelt. Mit einer Pasteurpipette wurde das Gemisch in Häemocytometer (Neubauer) überführt. Danach wurden die Zählkammern ohne CO₂ bei 37° C 60 min. lang in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der Inkubation wurden alle Zellen im Bereich der Erythrozytenquadranten gezählt (1. Zählung). Im entscheidenden Schritt des Versuchs wurden nun die nichtadhärenten von den adhärenen Zellen getrennt. Dazu wurde das Häemocytometer ganz langsam in eine mit 0,9 % NaCl-Lösung (20° C) gefüllte Petrischale gesenkt.

Die Zählkammer wurde dabei horizontal gehalten und langsam untergetaucht. Das Deckglas löste sich so von der Kammer ab und konnte vorsichtig mit der Pinzette abgehoben werden. Die Zählkammer wurde nun wieder angehoben und vertikal in ein Becherglas mit 0,9 % NaCl-Lösung (20° C) gesenkt, um 180° gedreht und noch einmal eingetaucht. Anschließend wurde die Zählkammer in die Horizontale gedreht, ein Tropfen Medium auf die Rillen gebracht und das trockene Deckglas sehr vorsichtig mittels Pinzetten auf die Kammer gelegt. Die Hämocytometer wurden so für 1 - 2 Stunden in feuchten Kammern bei Zimmertemperatur belassen und schließlich wurden die Erythrozytenfelder ausgezählt (2. Zählung). Die Bestimmung erfolgte in 2 oder 3-fach Ansätzen.

Die adhärenenten Zellen (2. Zählung) wurden in Prozent der vor dem Abschwemmen gezählten Zellen (1. Zählung) angegeben. Die Ergebnisse wurden ausgedrückt als Index adhärenenten Zellen A I.

$\%$ adhärenenten Zellen ohne Antigen (= Leerwert)

- $\%$ adhärenenten Zellen mit Tumorantigen

A I = -----x 100

$\%$ adhärenenten Zellen mit Tumorantigen

2.2.2. Leukozyten-Adhärenz-Inhibitionstest mit der Röhrchenmethode

Die Zellen aus der oben beschriebenen Lymphozyten-, bzw. Leukozytenpräparation wurden auch mit der Röhrchenmethode getestet. Die Zellen wurden dazu auf 1×10^7 /ml Medium TC 199 eingestellt. Es wurden also Zellen aus identischen Präparationen sowohl mit der Zählkammermethode, als auch mit der Röhrchenmethode am gleichen Tag untersucht.

Testansatz: Je 0,1 ml (= 1×10^6 Zellen) der Lymphozyten-, bzw. Leukozytensuspension und 0,1 ml einer 1:5 Verdünnung des Tumorextraktes wurde in speziell gespülte 15 cm hohe Glasröhrchen pipettiert und mit Medium TC 199 auf ein Endvolumen von 0,33 ml aufgefüllt. Zur Bestimmung des Leerwerts wurde statt des Tumorextraktes 0,1 ml PBS zugegeben.

Tab. 5: Testansatz, Röhrchenmethode des L A I

	Probe	Leerwert
Zellen	0,1 ml	0,1 ml
Tumorantigen	0,1 ml	-----
PBS	-----	0,1 ml
Medium TC 199	0,13 ml	0,13 ml

Die Suspension in jedem Röhrchen wurde mit einer Pasteurpipette gemischt und die Röhrchen dann zwei Stunden bei 37° C und einer CO₂ Spannung von 5 % horizontal inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen vertikal plaziert und ihr Inhalt mit einer Pasteurpipette vorsichtig gemischt und abgesaugt. Die Anzahl der so gewonnenen nichtadhärenten Zellen pro ml wurde in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und in Prozent der in den Test eingesetzten Zellkonzentration angegeben.

Der Index nichtadhärenter Zellen wurde definiert als N A I:

$$\begin{array}{l} \% \text{ nichtadhärenter Zellen mit Tumorantigen} \\ - \% \text{ nichtadhärenter Zellen ohne Antigen (=Leerwert)} \\ \text{N A I} = \frac{\phantom{\% \text{ nichtadhärenter Zellen mit Tumorantigen}}}{\phantom{- \% \text{ nichtadhärenter Zellen ohne Antigen (=Leerwert)}}} \times 100 \\ \phantom{\text{N A I} = } \% \text{ nichtadhärenter Zellen ohne Antigen (= Leerwert)} \end{array}$$

Der Test wurde in Zweifachansätzen durchgeführt.

2.3. Trypan-Blau-Färbung

Die Vitalitätstestung sowohl der A-Mel 3 Zellen, als auch der in Experimenten verwendeten Lymphozyten erfolgte mit der Trypan-Blau-Färbung. Dazu wurden 1 Microliter der zu testenden Zellsuspension mit 0,5 Microliter einer 1%-igen isotonen Trypan-Blau-Lösung* auf einem Objektträger vermischt und mit einem Deckglas (24 x 24 mm) abgedeckt. Das Zytoplasma toter Zellen verfärbt sich blau, da tote Zellen eingedrungenen Farbstoff nicht aktiv eliminieren können. Unter dem Mikroskop** läßt sich der Anteil lebender, also heller Zellen bestimmen. Die getesteten Zellpräparationen bestanden zu 80-90 % aus vitalen Zellen.

2.4. Statistische Berechnungen

Zur statistischen Kontrolle der Fehlerbreite wurde die Standardabweichung des Mittelwertes SAM ($\bar{x} \pm s_x$) herangezogen. Sind Ergebnisse zweier Gruppen gegenübergestellt, wurden diese auf Normalverteilung und Varianz untersucht. Anschließend wurde die Signifikanz der Aussage auf dem 5%-Niveau durch den t-Test nach Student überprüft.

* 2% Trypanblau in aqua dest. 1:1 mit 1,8 % NaCl, scharf abzentrifugiert

** 80-fache Vergrößerung, Firma Zeiss

C. ERGEBNISSE

1. In vivo Versuche

1.1. Hauttransplantation

Die Transplantate wurden über einen Zeitraum von 60 Tagen kontrolliert. Makroskopisch ergab sich kein Anhalt auf eine Abstoßungsreaktion. Die übertragene Haut, sowohl isogene, als auch autologe, heilte gut, ohne nekrotisch zu werden, ein. Auf den Transplantaten wuchsen die Haare nach.

Die Tatsache, daß die Hauttransplantate von den Empfängern mehr als 60 Tage akzeptiert wurden, läßt auf einen hohen Grad an Histokompatibilität zwischen den aus einem Ursprungspaar gezüchteten Goldhamstern schließen.

1.2. Tumordinokulation mit unterschiedlichen Zellzahlen

Die Angehrate des A-Mel 3-Melanoms beträgt in allen Gruppen 100%. Allerdings treten die Tumoren bei niedrigen Tumorzelldosen deutlich später auf, als nach Inokulation einer hohen A-Mel 3 Dosis. So erscheinen die Tumoren klinisch in Gruppe III (1×10^5 Zellen) schon nach 5,8 Tagen, in Gruppe II (1×10^4 Zellen) nach 9,0 und in Gruppe I (1×10^3 Zellen) signifikant später erst nach 13 Tagen (Abb.2).

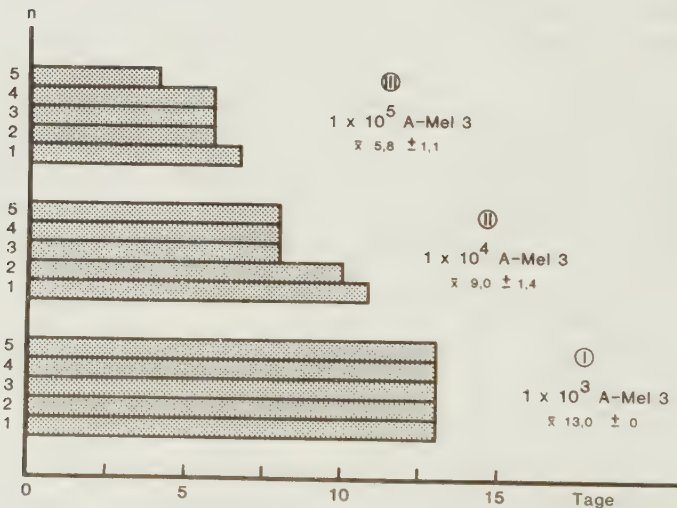


Abb. 2: Tage bis zum Auftreten der Tumoren nach Inokulation verschiedener Tumorzellzahlen

Die unterschiedliche Tumorbelastrung beeinflusst die Latenzphase des Tumorwachstums, also die Phase bis zum klinischen Erscheinen der Melanome. Nachdem ein palpabler Tumor entstanden ist, ist der weitere Verlauf des Wachstums von der inokulierten Zellzahl unabhängig (Abb.3). Der Tumor nimmt ständig an Größe zu und führt schließlich zum Tod der Tiere.

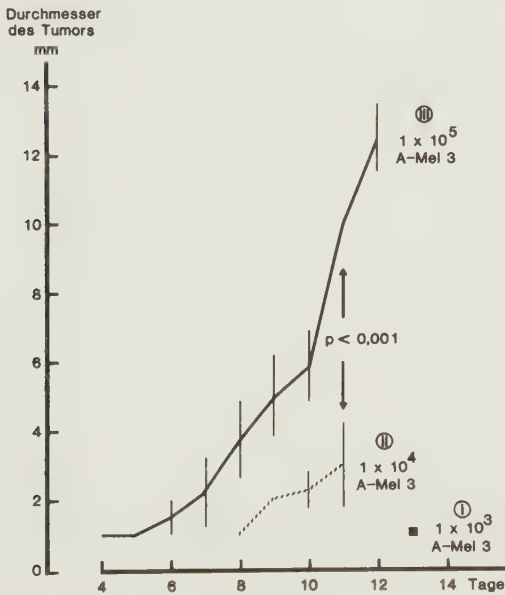


Abb. 3: Wachstum des A-Mel 3 in Abhängigkeit von der inokulierten Zellzahl

1.3. Splenektomie und Tamorinokulation

1.3.1. Gruppe I: Splenektomie und gleichzeitige Inokulation von 5×10^6 A-Mel 3-Zellen

Die Versuchstiere (Sx) und die scheinoperierten Tiere (Ko) verlieren in der direkten postoperativen Phase an Gewicht, nehmen ab den 4. postoperativen Tag aber wieder zu, ohne bei Versuchsende (8. Tag) ihren Ausgangswert ganz erreicht zu haben (Tab. 6).

Tab. 6: Verläufe des Körpergewichts (KG) der splenektomierten Hamster und Kontrollen

Körpergewicht in (g) am Tag

Sx (n=7)	107 $\pm$ 18	99 $\pm$ 19	103 $\pm$ 18
----------	--------------	-------------	--------------

Ko (n=8)	126 $\pm$ 12	118 $\pm$ 11	120 $\pm$ 11
----------	--------------	--------------	--------------

Die Veränderungen des Gewichtes nach Operation und Tumorgabe sind nicht signifikant.

Das Tumorgewicht der splenektomierten Tiere ist deutlich aber nicht signifikant niedriger als das der Kontrollen (Tab. 7).

Tab. 7: Tumorgewichte der splenektomierten Tiere (Sx)
und Kontrollen (Ko)

Sx		Ko	
Tier Nr.	Tu-Gewicht (g)	Tier Nr.	Tu-Gewicht (g)
1	5,2	1	7,2
2	2,0	2	12,3
3	8,1	3	4,3
4	10,1	4	12,9
5	1,0	5	6,9
6	9,0	6	8,0
7	5,2	7	8,5
		8	14,8
$\bar{x} \pm s_x$		$\bar{x} \pm s_x$	
5,8 $\pm$ 3,5		9,4 $\pm$ 3,6	

Ebenso ist der Durchmesser der Tumoren der splenektomierten Hamster während des gesamten Versuchs kleiner als der der Kontrollen. Dieser Unterschied ist am Tag 4 signifikant (Abb.4). Die Splenektomie vermag also bei einer hohen Tumorbelastrung von 5×10^6 Zellen das Wachstum der Tumoren zu hemmen.

1.3.2. Gruppe II: Splenektomie und gleichzeitige Inokulation
von 1×10^5 A-Mel 3 Zellen

Die Hamster beider Gruppen verlieren postoperativ an Gewicht. Der Verlust beträgt bis zum 10. Tag bei den splenektomierten Tieren im Durchschnitt 8,7 % bei den scheinoperierten Tieren 10,8 % (Tab. 8).

Tab. 8: Gewichtsverläufe der splenektomierten Tiere (Sx) und Kontrollen (Ko)

Körpergewicht in (g) am Tag

	0	3	4	5	7	10
Sx (n=7)	125 $\pm$ 2,9	115 $\pm$ 6,4	113 $\pm$ 8,3	113 $\pm$ 7,6	113 $\pm$ 7,7	114 $\pm$ 6,0
Ko (n=7)	122 $\pm$ 12,3	112 $\pm$ 13,0	112 $\pm$ 12,7	111 $\pm$ 12,3	110 $\pm$ 11,8	109 $\pm$ 11,5

Die entsprechenden Tumorgewichte von splenektomierten und scheinoperierten Tieren sind in Tab. 9 gegenübergestellt.

Tab. 9: Tumorgewichte splenektomierter (Sx) und scheinoperierter Hamster (Ko). Tumordosis 1×10^5 A-Mel 3 Zellen.

Splenektomie

Kontrolle

Tier Nr.	Tu-Gewicht (g)	Tier Nr.	Tu-Gewicht (g)
1	0,65	1	0,58**
2	1,52	2	1,90
3	7,41*	3	1,75
4	3,45	4	1,15
5	3,95	5	1,30
6	1,70	6	1,35
7	4,10*	7	1,00

$\bar{x} \pm s_x$ $2,25 \pm 1,4$

$1,41 \pm 0,35$

Zwischen den Tumorgewichten der splenktomierten Tiere und der Kontrollen besteht kein signifikanter Unterschied. Allerdings treten die Melanome in der splenektomierten Gruppe signifikant ($p < 0,05$) später auf. Bei den Kontrollen erscheinen die Tumoren nach $5,1 \pm 0,9$ Tagen, bei splenektomierten Tieren erst nach $6,4 \pm 1,0$ Tagen (Abb. 5).

* infiltratives Wachstums des Tumors in den köchernen Thorax

** ulzerierendes Wachstum des Tumors

*, ** wurden bei der Mittelwertberechnung nicht berücksichtigt

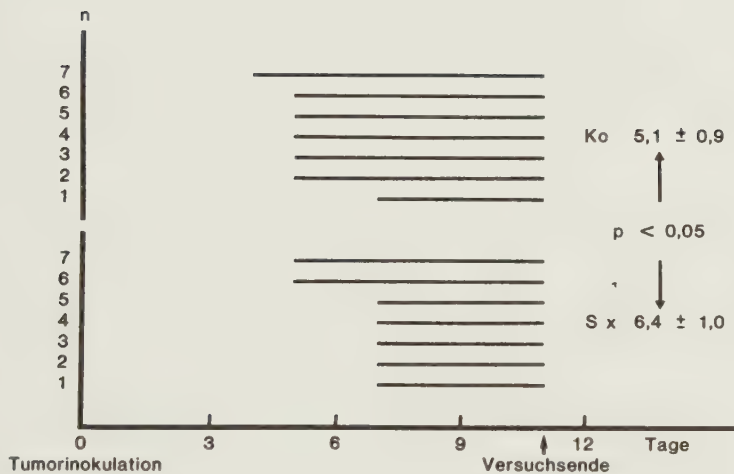


Abb. 5: Auftreten der Tumoren bei splenektomierten (Sx) und scheinoperierten (Ko) Hamstern. Tumordosis 1×10^5 A-Mel 3 Zellen.

Bei Inokulation von 1×10^5 A-Mel 3 Zellen verlängert Splenektomie den Zeitraum bis zum klinischen Erscheinen der Tumoren signifikant ($p < 0,05$).

1.3.3. Gruppe III: Splenektomie und gleichzeitige Inokulation
von 5×10^3 A-Mel 3 Zellen

Tabelle 10 stellt den Verlauf des Körpergewichts der Hamster nach der Operation bis Versuchsende (16. Tag) dar.

Tab. 10 Gewichtsverläufe der splenektomierten (Sx) und scheinoperierten (Ko) Hamster.

Körpergewicht in (g) am Tag

	0	1	4	6	8	11	16
Sx (n=10)	123 $\pm$	116 $\pm$	116 $\pm$	116 $\pm$	116 $\pm$	117 $\pm$	116 $\pm$
	29,6	27,2	23,9	22,4	21,4	19,3	19,3
Ko (n=10)	120 $\pm$	113 $\pm$	114 $\pm$	116 $\pm$	115 $\pm$	114 $\pm$	114 $\pm$
	41,0	38,6	35,3	32,2	31,9	29,7	27,4

Die Tiere verlieren postoperativ an Gewicht. Durchschnittlich beträgt die Gewichtsabnahme bei den splenektomierten Hamstern über den gesamten Versuchszeitraum 5,3 %, bei den scheinoperierten Tieren 4,6 %. Die Gewichtsänderungen sind nicht signifikant.

In Tabelle 11 sind die Tumornaßgewichte gegenübergestellt.

Tab. 11: Tumornaßgewichte (g) der splenektomierten und scheinoperierten Hamster. Tumordosis 5×10^3 A-Mel 3 Zellen.

Splenektomie		Kontrolle	
Tier Nr.	Tu-Gewicht (g)	Tiere Nr.	Tu-Gewicht (g)
1	4,1	1	1,4
2	0,6	2	1,4
3	1,1	3	1,4
4	1,4	4	0,6
5	1,0	5	1,9
6	0,6	6	1,8
7	3,1*	7	1,3
8	6,0**	8	1,6
9	2,2	9	2,8
		10	1,7
$\bar{x} \pm s_x$ 1,57 $\pm$ 1,24		1,59 $\pm$ 0,56	

* ulzerierendes Wachstum des Tumors

** infiltratives Wachstum des Tumors

*, ** wurden bei der Mittelwertberechnung nicht berücksichtigt

Nach Gabe von 5×10^3 A-Mel 3 Zellen hat die Splenektomie keinen Einfluß auf das finale Tumorgewicht. Die Tumoren wiegen in der splenektomierten Gruppe 1,57 g, in der Kontrollgruppe 1,59 g (Tab. 11). Die Melanome treten in beiden Gruppen auch gleichzeitig auf (Abb. 6).

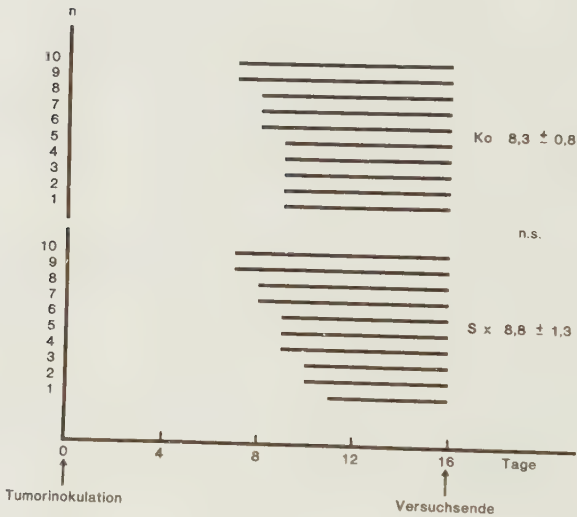


Abb. 6: Auftreten der Tumoren bei splenektomierten Tieren (Sx) und Kontrollen (Ko). Tumordosis 5×10^3 A-Mel 3 Zellen.

Als weiterer Parameter für das Wachstum wurden Länge und Breite der Melanome täglich gemessen. Man erhält so ein Maß für die oberflächliche Ausdehnung der Tumoren (Abb. 7). Länge und Breite wurden addiert und gegen den Beobachtungszeitraum aufgetragen.

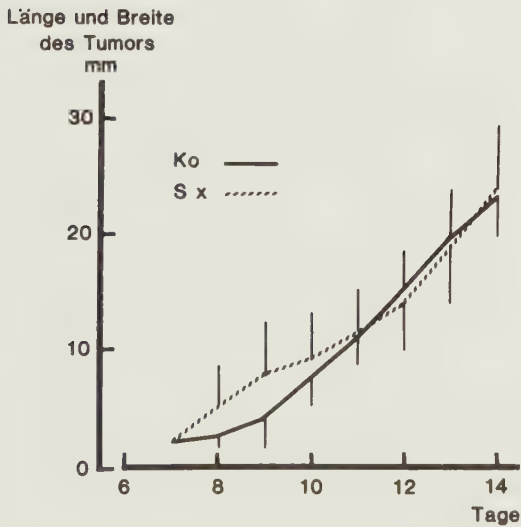


Abb. 7: Wachstum des A-Mel 3 bei splenektomierten Tieren und Kontrollen.

Die Wachstumskurve der splenektomierten Tiere zeigt keinen Unterschied zu der der Kontrollen.

Splenektomie bei gleichzeitiger Inokulation von 5×10^3 Zellen beeinflußt weder die Wachstumskinetik - zeitliches Auftreten und Größenzunahme der Tumoren - noch das finale Tumorgewicht.

1.3.4. Gruppe IV: Splenektomie, 14 Tage vor Inokulation von
 5×10^3 A-Mel 3-Zellen

In Tabelle 12 ist der Verlauf des Körpergewichts dargestellt.

Tab. 12: Körpergewichtsverlauf bei splenektomierten (Sx) und Kontrollen (Ko)

Körpergewicht in (g) am Tag nach Tu-Inokulation							
	-14 (=Op)	1	4	6	8	11	20
Sx (n=10)	118 $\pm$	109 $\pm$	111 $\pm$	111 $\pm$	112 $\pm$	112 $\pm$	113 $\pm$
	23,3	17,3	16,2	15,7	17,0	16,8	13,0
Ko (n=13)	121 $\pm$	110 $\pm$	109 $\pm$	109 $\pm$	109 $\pm$	109 $\pm$	120 $\pm$
	24,6	23,4	20,9	23,0	22,8	23,0	13,8

Die Tiere der Gruppe IV gleichen den Gewichtsverlust, den sie durch die Operation erleiden, weitgehend wieder aus. Die Entwicklung des Tumors allein scheint trotz der oft großen Ausdehnung nicht zu einer deutlichen Gewichtsabnahme zu führen.

Tab. 13: Tumornaßgewichte der splenktomierten (Sx) Hamster und Kontrollen (Ko). Tumordosis 5×10^3 A-Mel 3 Zellen

Splenektomie

Kontrollen

Tiere Nr.	Tu-Gewicht (g)	Tiere Nr	Tu-Gewicht (g)
1	3,4	1	9,1
2	1,1	2	3,0
3	5,2	3	2,5*
4	3,8	4	8,8
5	2,1	5	5,6
6	5,3*	6	2,6
7	5,4	7	4,2
8	7,2	8	4,4
9	6,0	9	5,4
10	3,5	10	4,3
		11	1,2*

x _± sx	4,2 _± 1,9	5,3 _± 2,3
-------------------	----------------------	----------------------

* ulzerierendes Tumorwachstum, wurden bei der Mittelwertberechnung nicht berücksichtigt

Die Splenektomie, 14 Tage vor Gabe von 5×10^3 Zellen beeinflußt das finale Tumorgewicht nicht signifikant. Nach Splenektomie wiegen die Tumoren im Durchschnitt 4,2 g, bei den Kontrollen 5,3 g (Tab. 13). Auch die Latenzphase des A-Mel 3 ist nahezu identisch. Nach Splenektomie treten die Tumoren nach 9,4 Tagen, in der Kontrollgruppe nach 8,7 Tagen auf (Abb.8).

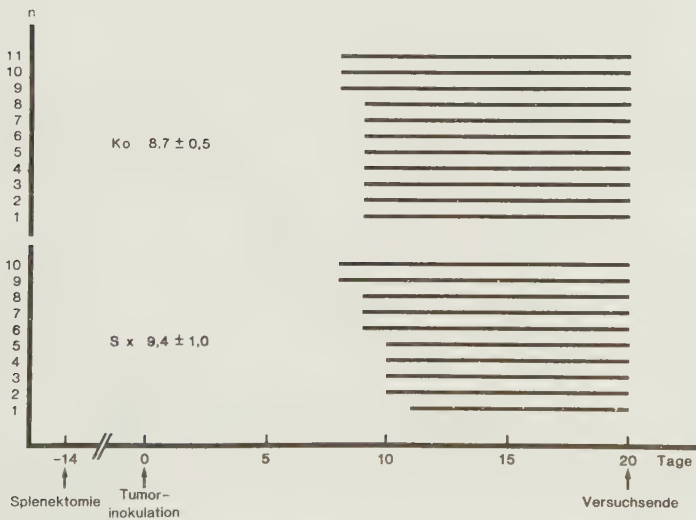


Abb. 8: Auftreten der Tumoren bei splenektomierten (Sx) und scheinoperierten (Ko) Hamstern. Tumordosis 5×10^3 A-Mel 3 Zellen (14 Tage nach Splenektomie).

Die Wachstumsverläufe (Abb. 9) der Tumoren sind nach Splenektomie flacher als bei den Kontrollen. Der Unterschied ist nicht signifikant.

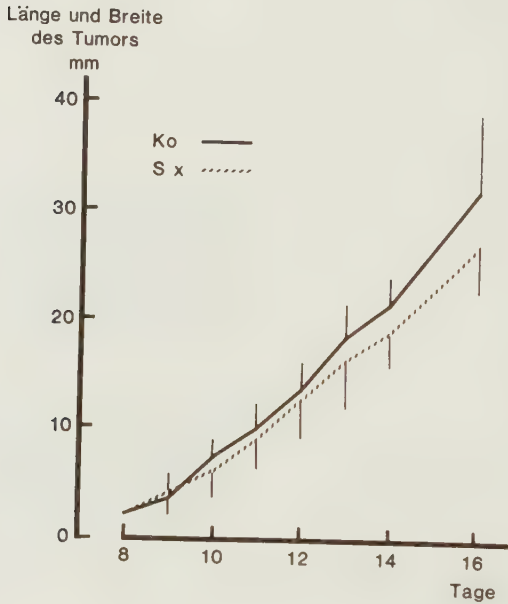


Abb. 9: Wachstum des A-Mel 3 Melanoms bei splenektomierten Tieren und Kontrollen. Splenektomie 14 Tage vor Tumordinokulation. Tumordosis 5×10^3 A-Mel 3 Zellen.

1.3.5. Gruppe V: Splenektomie, 4 Tage nach Tumorinokulation.

Tumordosis 5×10^3 A-Mel 3 Zellen

In der folgenden Tabelle ist der Verlauf des Körpergewichts dargestellt. Die Splenektomie erfolgte 4 Tage nach Tumorinokulation.

Tab. 14: Körpergewichtsverläufe in (g) bei splenektomierten Tieren (Sx) und Kontrollen (Ko)

Körpergewicht (g) am Tag nach Tumorinokulation				
	4 (=Op)	6	8	21
Sx (n=10)	113 $\pm$ 15,7	111 $\pm$ 13,5	111 $\pm$ 13,2	110 $\pm$ 11,2
Ko (n=10)	121 $\pm$ 10,1	113 $\pm$ 8,0	112 $\pm$ 7,2	112 $\pm$ 8,1

Tabelle 15 zeigt eine Gegenüberstellung der Tumornaßgewichte bei Versuchsende.

Tab. 15: Tumornaßgewichte (g) splenektomierter und scheinoperierter Hamster. Tumordosis 5×10^3 A-Mel 3 Zellen.

Splenektomie

Kontrolle

Tier Nr.	Tu-Gewicht (g)	Tier Nr.	Tu-Gewicht (g)
1	2,6	1	2,9
2	3,0	2	2,2
3	2,5	3	2,5
4	2,3	4	2,4
5	2,3	5	0,9
6	4,2	6	5,1
7	5,7	7	3,7
8	2,5	8	2,2
9	6,0	9	2,1
10	1,3	10	1,4
$\bar{x} \pm s_x$	$3,2 \pm 1,6$		$2,5 \pm 1,2$

Splenektomie, 4 Tage nach Tumorinokulation, hat nur einen unbedeutenden Einfluß auf das finale Tumorgewicht. Es beträgt 3,2 g gegenüber 2,5 g bei den Kontrollen (Tab. 15). Auch die Latenzphasen sind weitgehend identisch. Die Tumoren erscheinen nach Splenektomie nach 8,2 Tagen, bei den scheinoperierten Hamstern nach 7,9 Tagen (Abb. 10).

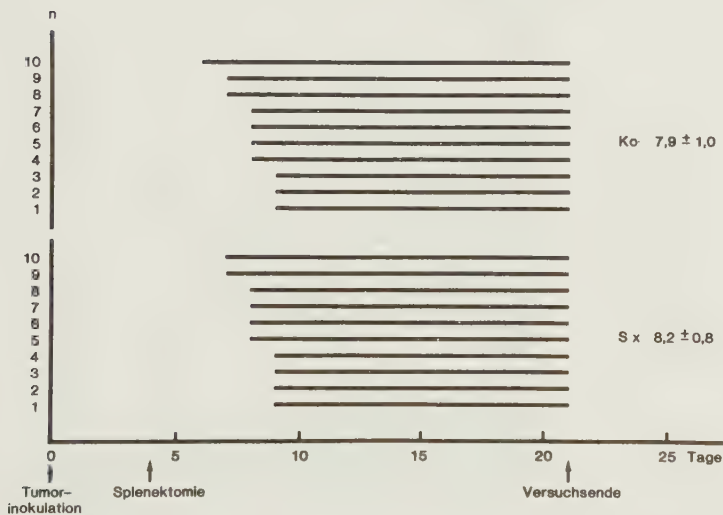


Abb. 10: Auftreten der Tumoren bei splenektomierten (Sx) und scheinoperierten (Ko) Hamstern.
Tumordosis 5×10^3 A-Mel 3 Zellen.

Die Größenzunahme der Melanome wird durch Splenektomie nicht beeinflusst (Abb. 11).

Splenektomie, 4 Tage nach Inokulation von 5×10^3 Zellen, beeinflusst weder die Wachstumskinetik noch das finale Gewicht der Tumoren.

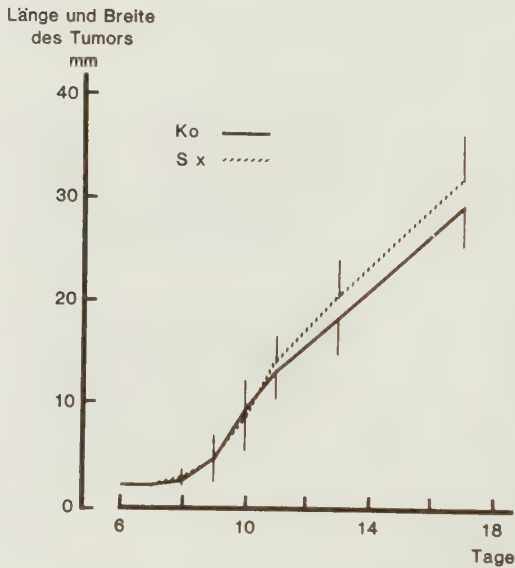


Abb. 11: Wachstum des A-Mel 3 Melanoms nach Splenektomie, bzw. Kontrollen.

1.4. Transfer von Lymphozyten tumortragender Tiere und gleichzeitige Tumorinokulation

Der Einfluß tumorsensibilisierter Lymphozyten auf das Wachstum des A-Mel 3 Melanoms wurde untersucht. Die Lymphozyten stammten von Hamstern, die vor 5, bzw. 12 Tagen 4×10^5 A-Mel 3 Zellen inokuliert erhielten. Alle Versuchstiere entwickelten unabhängig von ihrer Vorbehandlung mit Lymphozyten vom Tag 5, bzw. vom Tag 12 und unabhängig von ihrem Geschlecht Melanome.

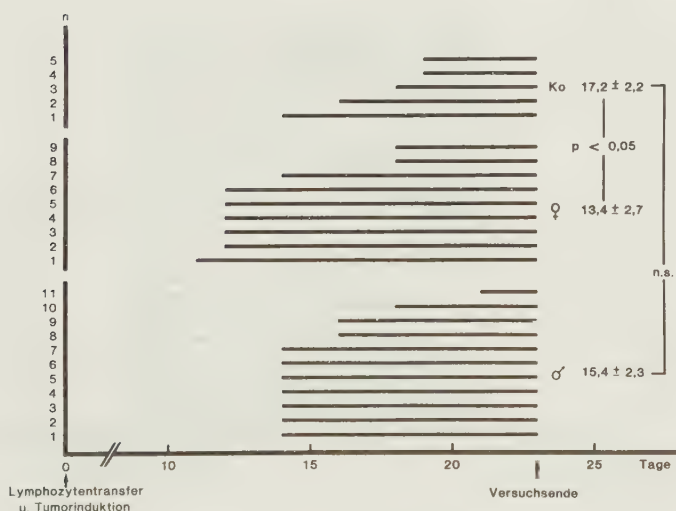


Abb. 12: Auftreten der Tumoren bei Tieren, die sensibilisierte Lymphozyten (Tag 5) erhielten und Kontrollen. Tumordosis 5×10^3 A-Mel 3 Zellen

Die Tumoren treten bei den Tieren, die mit Lymphozyten vom Tag 5 behandelt wurden, früher auf. Bei den weiblichen Hamstern ist der Zeitraum bis zum Tumornachweis signifikant ($p < 0,05$) kürzer (Abb. 12). Hier finden sich schon nach 13,4 Tagen Melanome, während bei den Kontrolltieren Tumore erst nach 17,2 Tagen palpabel sind.

Die Gabe von Lymphozyten vom Tag 12 führt zu keiner zeitlichen Verschiebung der Tumorentwicklung. Die Melanome treten bei Versuchstieren und Kontrolltieren gleichzeitig auf (Abb. 13).

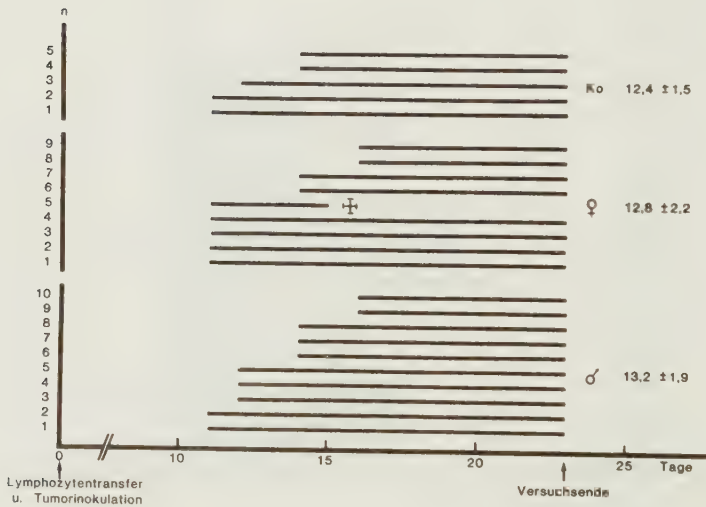


Abb. 13: Auftreten der Tumore bei Tieren, die sensibilisierte Lymphozyten (Tag 12) erhielten und Kontrollen. Tumordosis 5×10^3 A-Mel 3 Zellen.

Bei einem zweiten Versuch stammten die transplantierten Lymphozyten von Hamstern, die den Tumor 4, bzw. 10 Tage lang trugen. In diesem Experiment, das nur mit weiblichen Tieren durchgeführt wurde, war die Latenzphase bis zum Auftreten der Tumoren bei den beiden Versuchsgruppen (Tag 4 und Tag 10) fast identisch (Abb. 14).

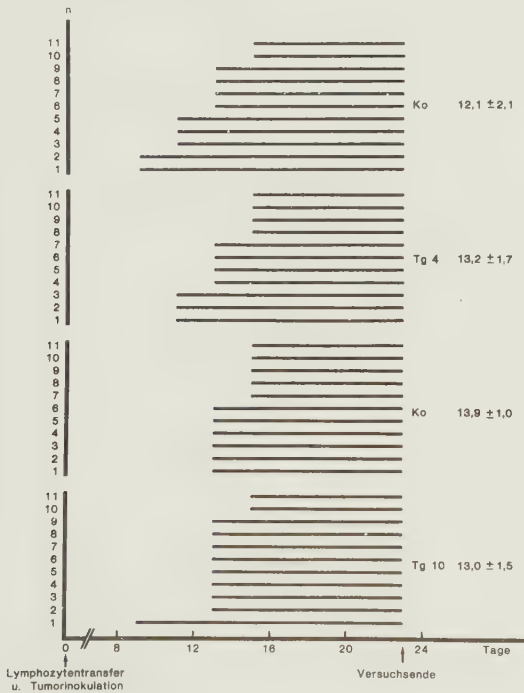


Abb. 14: Auftreten der Tumoren bei Tieren, die sensibilisierte Lymphozyten vom Tag 4, bzw. Tag 10 erhielten und Kontrollen. Tumordosis 5×10^3 A-Mel 3 Zellen.

2. In vitro Versuche

2.1. Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Der quantitative Anteil der B-Lymphozyten in lymphatischen Organen (Milz, Thymus, Lymphknoten) und im peripheren Blut wurde bestimmt.

Bei den Lymphknoten (LK) wurde unterschieden zwischen den Tumor drainierenden LK (ipsilateraler axillärer LK) und den Tumor nicht drainierenden LK (kontralateraler axillärer, inguinaler, poplitealer und paraaortaler LK).

Tab. 16: Prozentualer Anteil der B-Lymphozyten bei splenektomierten (Sx) und scheinoperierten (Ko) tumortragenden Hamstern

	Milz	Thymus	drain. LK	nicht-drain.LK	Blut
Sx	44,0 $\pm$ 12,6*	2,5 $\pm$ 1,7	33,0 $\pm$ 10,07	31,1 $\pm$ 11,5	26,9 $\pm$ 11,6
n	6	4	33	89	21
Ko	38,2 $\pm$ 12,3	2,2 $\pm$ 2,9	29,6 $\pm$ 11,3	34,6 $\pm$ 10,5	29,9 $\pm$ 9,1
n	38	6	42	98	19

* Die Entnahme der Milz erfolgte vor Tumorinokulation.

Der prozentuale Anteil von $44,01 \pm 12,6$ entspricht also dem Anteil von B-Lymphozyten in der Milz unbehandelter Hamster. In den soliden Tumoren der Versuchstiere wurden ebenfalls mit der Immunfluoreszenzmethode Tumorzellen nachgewiesen, die auf ihrer Zellmembran IgG trugen. Bei den splenektomierten Hamstern waren $5,9 \pm 5,7$ % der Melanomzellen IgG-positiv ($n=22$), bei den scheinoperierten Tieren $6,8 \pm 5,5$ % ($n=16$).

2.2. L A I (Leukozyten-Adhärenz-Inhibitionstest)

Die Adhärenzfähigkeit von Leukozyten tumortragender Hamster an Glasoberflächen wurde untersucht.

2.2.1. Ergebnisse der Zählkammermethode

Tab. 17: Antigeninduzierte Leukozyten-Adhärenz-Inhibition von Milzlymphozyten

<u>A-Mel 3-Hamster</u>		<u>Kontrollen</u>	
% adhärenter Zellen nach Inkubation mit			
Tu-Antigen	PBS	Tu-Antigen	PBS
15	38	82	98
19	76	95	90
61	77	11	19
20	48	42	50
73	95	42	60
28	51	21	50
20	58		
23	69		
x+sx	32,4+21,9	48,8+33,3	61,2+29,0

Berechnet man den Index adhärenter Zellen, AI, so ergibt sich bei den A-Mel 3-Hamstern 97,5 gegenüber 25,4 bei den Kontrolltieren.

Jeder Wert entspricht dem Testergebnis von Lymphozyten von 5 Hamstern. Die Zellen wurden gepoolt, um die für die Testansätze (Zählkammer- und Röhrchenmethode) erforderlich hohe Zellzahl zu erhalten.

Die Zellen von A-Mel 3 Hamstern, sowohl Milzlymphozyten, als auch Leukozyten aus dem Blut verlieren nach Inkubation mit einem A-Mel 3-Extrakt als Tumorantigen ihre Fähigkeit zur Glasadhärenz (Tab. 17 und 18). So sinkt der Prozentsatz adhärenter Milzlymphozyten der A-Mel 3-Hamster nach Inkubation mit Tumorantigen von 64,0 % signifikant auf 32,4 %, der der Blutleukozyten von 53,0 % auf 28,8 %.

Bei den Kontrolltieren ist die Abnahme des Prozentsatzes adhärenter Zellen sowohl bei Milzlymphozyten, als auch bei Leukozyten nicht signifikant. Die Prozentsätze adhärenter Zellen nach Inkubation mit PBS - also die Leerwerte - unterscheiden sich bei A-Mel 3 Hamstern und Kontrolltieren nicht.

Tab. 18: Antigeninduzierte L A I von Leukozyten aus dem Blut

<u>A-Mel 3-Hamster</u>		<u>Kontrollen</u>		
% adhärenter Zelle nach Inkubation mit				
Tu-Antigen	PBS	Tu-Antigen	PBS	
48	83	89	35	
62	89	57	60	
26	29	86	64	
59	59	71	100	
41	47	35	32	
22	22	67	60	
9	41	53	27	
16	30	49	78	
8	30	48	71	
21	79	32	33	
17	56	20	57	
17	71	22	61	
		38	48	
		19	44	
x _± s _x	28,8 _± 18,9	53,0 _± 23,4	49,0 _± 23,1	55,0 _± 20,3

Index adhärenter Zellen AI:

A-Mel 3-Hamster 84,0

Kontrollen 12,2

2.2.2. Ergebnisse der Röhrenmethode

Die Ergebnisse der Röhrenmethode entsprechen den oben dargestellten Befunden. So erhöhte sich der Prozentsatz nichtadhärenter Zellen der A-Mel 3-Hamster nach Inkubation mit Tumorigenen signifikant, während bei den Zellen von Kontrolltieren keine Veränderungen gefunden wurden (Tab. 19 und 20). Inkubiert man die Lymphozyten, bzw. Leukozyten mit PBS, so treten auch mit der Röhrenmethode keine Unterschiede zwischen tumortragenden Tieren und Kontrollen auf.

Tab. 19: Antigeninduzierte L A I von Milzlymphozyten.

A-Mel 3-Hamster		Kontrollen		
% nichtadhärenter Zellen nach Inkubation mit				
Tu-Antigen	PBS	Tu-Antigen	PBS	
12	8	8	3	
41	5	12	6	
35	10	4	3	
26	8	19	13	
33	3	22	14	
28	10	29	11	
19	6	41	32	
58	35	67	61	
63	47	79	40	
		63	54	
x+sx	35,0+16,8	14,7+15,4	33,5+25,2	23,7+21,6

Index nichtadhärenter Zellen N A I:

A-Mel 3-Hamster 138,0

Kontrollen 41,3

Tab. 20: Antigeninduzierte L A I von Leukozyten aus dem Blut.

A-Mel 3-Hamster		Kontrollen		
% nichtadhärenter Zellen nach Inkubation mit				
Tu-Antigen	PBS	Tu-Antigen	PBS	
80	31	35	33	
38	32	29	19	
34	24	30	38	
27	6	33	38	
48	36	7	8	
55	41	4	3	
100	52	58	35	
25	21	72	61	
68	47	72	57	
71	42	29	12	
50	40	20	14	
70	53	48	39	
		70	40	
		70	60	
x±sx	55,5±22,9	35,4±13,6	41,2±23,9	32,6±19,1

Index nichtadhärenter Zellen N A I:

A-Mel 3-Hamster 56,8

Kontrollen 26,4

Beide Methoden führen zu übereinstimmenden Ergebnissen:

Milzlymphozyten und Leukozyten von A-Mel 3-tragenden Hamstern verlieren ihre Fähigkeit zur Adhärenz an Glasoberflächen, wenn sie einem Antigenextrakt ihres spezifischen Tumors ausgesetzt werden. Zellen von Kontrolltieren behalten ihre Adhärenzfähigkeit.

D. DISKUSSION

Tumorwachstum und Immunsystem

Obwohl eines der typischen Charakteristika des Krebses seine scheinbare Autonomie ist, d.h. seine Fähigkeit, unabhängig von Wirtseinflüssen sich zu entwickeln und zu metastasieren, ist das Wachstum vieler Tumoren von Wirtsfaktoren abhängig. So ist bei Patienten mit primären oder sekundären Immunmangel-Erscheinungen eine gesteigerte Krebshäufigkeit zu beobachten (21). Eine statistische Erhebung über das Auftreten von Primärtumoren bei Transplantationspatienten während einer immunsuppressiven Therapie zeigte, daß die Häufigkeit für alle Arten von Krebs weit größer war (13/2000) als bei der Normalbevölkerung (8,2/100000) (43).

Offensichtlich verfügt das intakte Immunsystem des Tumorwirtes über Abwehrmechanismen, die gegen einen entstehenden Tumor wirksam sind. Das Wachstum und die Ausbreitung eines Tumors hängen nicht allein von den Eigenschaften des Neoplasmas ab.

So übt das Immunsystem -neben dem Schutz vor bakteriellen und viralen Infektionen und deren Toxinen- eine weitere Funktion aus: Die Verhinderung der Entstehung von Tumoren. Das Immunsystem würde ein Überwachungsorgan gegen Krebs darstellen, potentiell bösartige Zellen als fremd erkennen und durch eine spezifische Immunreaktion eliminieren (7).

Voraussetzung für eine solche immunologische Überwachungsfunktion bei der Entstehung von Neoplasmen sind folgende Bedingungen (53,57):

1. Die sich entwickelnde Tumorzelle muß antigen sein und das Tumor-Antigen muß früh in der Tumorentwicklung auftreten.
2. Das Tumor-Antigen muß in der Lage sein, im Wirt eine Immunreaktion auszulösen (d.h. immunogen sein).
3. Der Wirt muß immunologisch kompetent sein, um auf das Tumor-Antigen zu reagieren.
4. Die Immunreaktion des Wirtes darf nicht zur Toleranz oder Immunverstärkung (Enhancement) führen.
5. Die Expression des Antigens muß konstant sein und jede Tumorzelle muß ein erkennbares Antigen tragen.
6. Die Immunreaktion auf das Tumor-Antigen muß die Lebensfähigkeit der Tumorzelle beeinträchtigen (zytotoxisch sein) oder das Wachstum der Tumorzellen hemmen (zytostatisch).

Der Mechanismus der Tumorzell-Zerstörung beruht im Wesentlichen auf der Wechselwirkung zwischen sensibilisierten Lymphozyten und Tumorzelloberflächen-Antigenen (29, 60). Sensibilisierte Lymphozyten können zu "Killer"-Zellen transformiert werden oder/und Mediatoren synthetisieren, die z.B. Makrophagen dazu aktivieren, Zielzellen (=Tumorzellen) zu zerstören.

Es gibt eine Vielzahl von Erklärungen, warum es zu einem Versagen dieser Immunüberwachung und damit zu einem progressiven Tumorwachstum kommen kann:

1. Der Tumor trägt kein Antigen, das vom Wirt erkannt werden kann oder das Tumor-Antigen ist nicht immunogen (3).
2. Immunsuppression oder eine Schwächung des allgemeinen Immunstatus des Wirtes, so daß dieser nicht entsprechend auf ein Tumor-Antigen reagieren kann (21, 43).
3. Tumorwachstum an "immunologisch privilegierten" Stellen, z.B. die Backentaschen des Hamsters (33).
4. Antigene Modulation oder Immunselektion einer variierenden Tumor-Antigenität (12).
5. Mangelndes Gleichgewicht zwischen Tumorwachstum und Immunreaktion des Wirtes, so daß es entweder zu einer ungenügenden antigenen Stimulation oder zu einer unzulänglichen Zerstörung von Tumorzellen durch den Wirt kommt (46).
6. Der Wirt verliert seine Reaktivität gegen das Tumor-Antigen (Toleranz) (58).
7. Humorale Antikörper blockieren den Effekt einer zellulären oder durch Antigen-Antikörper-Komplexe vermittelten Reaktion (Enhancement).
8. Induktion von Suppressor-Zellen, die mit Effektorzellen interferieren.

Der begünstigende Einfluß auf das Tumorwachstum durch Enhancing-Antikörper oder Suppressor-Zellen konnte im Tiermodell bereits näher untersucht werden. So führte die Übertragung von Tumoren auf Tiere, die vorher mit Tumormaterial immunisiert wurden, so daß humorale Antikörper entstanden, zu einem schnelleren Tumorwachstum als bei unbehandelten Tumorempfängern. Dasselbe war zu beobachten, wenn die Tumorempfänger vorher Serum von immunisierten Tieren injiziert erhielten (30,37,38,39).

Das Vorhandensein "blockierender Antikörper" begünstigte das Tumorwachstum. Diese "blockierenden Antikörper" sind nicht eindeutig identifiziert. Es könnte sich bei diesen das Immunsystem blockierenden Faktoren auch um Komplexe aus Tumor-Antigenen und Antikörper handeln, die die Reaktion sensibilisierter Lymphozyten oder "Killer"-Zellen mit dem Antigen auf der Tumorzelle verhindern (4, 36, 59, 62).

Auf der anderen Seite ist bekannt, daß eine Immunreaktion auf Tumor-Antigene nicht nur zur Bildung von "Killer"-Zellen führt, die gegen den Tumor wirken (8, 10, 30) sondern, daß auch Suppressor-Zellen induziert werden können, die die Immunantwort gegen den Tumor unterdrücken (2,11,22,24,45).

Pope unterscheidet spezifische Suppressor-Zellen, die nur die Immunantwort auf das Antigen supprimieren, gegen das sie sensibilisiert worden sind, von unspezifischen Suppressor-Zellen, die eine Immunreaktion generell unterdrücken (52). Die Suppression kann also antigenspezifisch (6) oder antigenunspezifisch sein (54). Die Suppressor-Zellen können die Immunreaktion an verschiedenen Schritten unterdrücken. So können sie die Reaktion der B-Zellen mit dem Antigen und damit die Produktion von Immunglobulin inhibieren (6) oder die Aktivitäten anderer T-Zellen einschränken (16, 23).

Der Milz scheint sowohl bei der Bildung von "enhancing-antibodies", als auch bei der Generation von Suppressor-Zellen eine besondere Bedeutung zuzukommen. Sie stellt eine wichtige Quelle für humorale Antikörper dar (56), also auch für "enhancing antibodies" (13, 14, 44, 48). Auf der zellulären Seite der Immunabwehr konnten in der Milz tumortragender Tiere bereits 24 Stunden nach Tumorgabe Suppressor-Lymphozyten nachgewiesen werden, die mit "Killer"-T-Lymphozyten interferieren und so das Tumorstadium fördern (19, 20).

In vorliegender Arbeit sollte der Einfluß der Splenektomie auf das Wachstum des transplantablen Hamstermelanoms A-Mel 3 untersucht werden. Die Untersuchungen wurden mit unterschiedlicher initialer Tumordosis und unterschiedlichen Zeitintervallen zwischen Splenektomie und Tumordinokulation durchgeführt. In weiteren Versuchen wurde der Effekt gegen den Tumor sensibilisierter Lymphozyten auf das Wachstum desselben Tumors in vivo untersucht.

Mit einem spezifischen immunologischen Test sollte nachgewiesen werden, daß es beim Wirt zu einer tumorantigen-spezifischen Sensibilisierung kommt, die Voraussetzung für eine Immunreaktion ist.

1. In vivo Versuche

1.1. Tumordinokulation mit unterschiedlichen Tumorzellzahlen

Es ist bekannt, daß fast alle transplantablen Tiertumoren Tumor-spezifische-Transplantations-Antigene (TSTA) tragen, die zu einer Immunreaktion des Wirtes führen (31).

Trotzdem entwickeln diese antigenen Tumoren ein progressives Wachstum und führen zum Tod der Tiere. Das zeigten auch eigene Versuche. Das amelanotische Hamstermelanom A.Mel 3 zeigte eine Angehrate von 100 % (Abb. 2) und zwar unabhängig von der Zahl der inokulierten A-Mel 3-Zellen.

Die initiale Tumordosis hat nur einen Einfluß auf den Zeitpunkt des klinischen Erscheinens des Tumors. Je höher die inokulierte Tumorzellzahl ist, desto früher erscheinen die Melanome (Abb.2). Nachdem jedoch ein Tumor nachweisbar wurde, führte er durch sein progressives Wachstum zum Tod der Versuchstiere (Abb. 3).

1.2. Splenektomie und Tumordinokulation mit hohen Tumorzellzahlen

Splenektomie führt bei chemisch induzierten Tumoren zu einer geringeren Tumorzinzidenz. So konnte Witting (64) im Mäusemodell zeigen, daß die Milzentfernung die Tiere vor der Entwicklung eines durch Benzpyren induzierten Tumors schützen kann.

Ähnliche Beobachtungen machten auch Lewin und Gericke (41) mit einem transplantablen Rattentumor. Die Milzexstirpation konnte das Tumorzuchstum unterdrücken.

In vorliegenden Untersuchungen findet sich bei hoher initialer Tumorzbelastung (5×10^6 A-Mel 3 Zellen, bzw. 10^5 A-Mel 3 Zellen) ein tumorprotektiver Effekt. Das finale Tumorzgewicht der splenektomierten Hamster ist deutlich niedriger als das der Kontrolltiere. In Gruppe II (1×10^5 A-Mel 3 Zellen) treten die Tumoren signifikant später auf (Tab. 21).

Tab. 24: Splenektomie und Tumordinokulation. Übersicht.

Gruppe	n	A-Wel 3 Zellen	Zeitpunkt der Splenektomie	Versuchsende (Tage nach Inokulation)	Tumorgewicht (g)	Auftreten der Tumoren (Tage nach Inokulation)
I	Sx	7	!	!	!	!
	!	!	!	!	!	!
	Ko	8	!	!	!	!
	!	!	!	!	!	!
II	Sx	7	!	!	!	!
	!	!	!	!	!	!
	Ko	7	!	!	!	!
	!	!	!	!	!	!
III	Sx	10	!	!	!	!
	!	!	!	!	!	!
	Ko	10	!	!	!	!
	!	!	!	!	!	!
IV	Sx	10	!	!	!	!
	!	!	!	!	!	!
	Ko	13	!	!	!	!
	!	!	!	!	!	!
V	Sx	10	!	!	!	!
	!	!	!	!	!	!
	Ko	10	!	!	!	!
	!	!	!	!	!	!

 $p < 0,05$

Diese Befunde korrelieren mit Beobachtungen von Pollack, der bei splenektomierten Mäusen eine beschleunigte Abstoßung von virusinduzierten Sarkomen fand (51).

Auch bei chemisch induzierten Carcinomen führte Splenektomie zu einer niedrigeren Tumorzinzidenz. Witting und Hultsch (64) beobachteten in einem Mäusemodell, daß die Angehrate eines Benzyren-induzierten Tumors durch Splenektomie gesenkt wird.

Der tumorprotektive Effekt der Splenektomie könnte auf das Fehlen von Suppressorzellen, die die Immunantwort auf den Tumor unterdrücken, zurückzuführen sein. So fand Pierce (50), daß die Milz von Ratten Zellen enthält, die die Antikörperproduktion unterdrücken können.

Auf der humoralen Seite der Immunantwort könnte durch Splenektomie die Bildung von "enhancing antibodies" verhindert werden.

Ferrer (14) schloß aus seinen Untersuchungen, daß die Milz bei der Produktion von "enhancing antibodies" einen wesentlichen Einfluß hat.

Die Splenektomie entzieht lymphoide Zellen, die entweder einen protektiven Einfluß auf den Tumor oder suppressiven Einfluß auf die Immunantwort, bzw. auf beides haben.

1.3. Splenektomie und Tumordinokulation mit niedriger Tumorzellzahl

Ein tumorprotektiver Effekt der Splenektomie ist bei einer niedrigen initialen Tumorbelastrung (5×10^3 A-Mel 3 Zellen) nicht zu beobachten (Tab. 21, Gruppe III).

Die Melanome treten gleichzeitig auf, und das finale Tumorgewicht ist fast identisch. Die Milzentfernung vermag hier die Immunantwort nicht zu beeinflussen.

Diesen "dosisabhängigen" Effekt der Splenektomie fanden auch Nordlund und Gershon (46): Nach Transplantation des Mäusemelanoms Cloudman S91 erschienen die Tumoren bei kleiner Tumorbelastrung (10^4 Zellen) bei den splenektomierten Mäusen früher als bei den Kontrolltieren. Nach Inokulation von 10^6 Melanomzellen kam es jedoch zu einem gegenteiligen Effekt.

Chang und Turk (9) konnten in ihren Experimenten mit dem Methylcholanthren-induzierten Aszitestumor bei Mäusen diese Beobachtungen bestätigen.

Für die Stimulation von Suppressorzellen oder "enhancing antibodies" in der Milz scheint ein größeres Angebot von Antigen nötig zu sein. Dafür sprechen auch die vorliegenden Untersuchungen mit dem A-Mel 3 Melanom.

1.4. Splenektomie, 14 Tage vor und 4 Tage nach Tumorinokulation

Die Variation des Intervalls zwischen Splenektomie und Tumorinokulation mit 5×10^3 Zellen beeinflußt weder die Wachstumskinetik der Melanome, noch das finale Tumorgewicht (Tab. 21).

Das mangelnde Angebot an Tumorantigenen aufgrund der geringen initialen Tumorbelastung führt unabhängig davon, ob die Splenektomie 14 Tage vor oder 4 Tage nach Tumorinduktion vorgenommen wird, zu keiner beobachtbaren Änderung der Immunantwort.

1.5. Transfer von Lymphozyten tumortragender Tiere

Um den Einfluß tumorantigensensibilisierter Lymphozyten auf das A-Mel 3 Wachstum zu untersuchen, wurden sensibilisierte Lymphozyten gleichzeitig mit den Melanomzellen auf Hamster übertragen.

Der Transfer von Lymphozyten, die 5 Tage nach in vivo Exposition mit dem Tumorantigen gewonnen wurden, bewirkt ein etwas früheres Auftreten der Melanome (Abb. 12). Es kommt zu einer Suppression der Immunantwort der Versuchstiere. Dieser Effekt verschwindet jedoch, wenn Lymphozyten vom Tag 12 übertragen werden (Abb. 13). In dem zweiten Experiment mit antigensensibilisierten Zellen von Tag 4 und 10 treten die Tumoren gleichzeitig mit den Kontrollen auf (Abb. 14). Der suppressive Effekt der tumorantigensensibilisierten Lymphozyten ist abhängig vom Zeitraum der Sensibilisierung und nur 5 Tage nach Antigenexposition nachweisbar.

Diese in vivo Beobachtung korreliert mit in vitro Befunden mit Hamstermilzzellen. Lause (40) untersuchte die Reaktivität von Milzzellen von MHA-Hamstern in einem allogenen System. Die MHA-Zellen wurden gegen lymphoide Zellen von CB-Hamstern immunisiert und in der "mixed lymphocyte reaction" getestet. Die Reaktion der MHA anti-CB-Milzzellen war am Tag 5 nach Immunisierung signifikant niedriger, während sie die ersten 3 Tage und ab dem 7. Tag nach Antigenexposition höher oder gleich der Reaktion von Milzzellen von nichtimmunisierten Tieren war. Lause schloß daraus, daß es 5 Tage nach Immunisierung zur Generation von Suppressorzellen kommt.

Der Einfluß von Suppressorzellen könnte auch das frühere Erscheinen der Melanome nach intraperitonealer Injektion von Lymphozyten vom Tag 5 erklären. Die Wirksamkeit der intraperitonealen Gabe von immunologisch kompetenten Zellen beim Hamster wurde von Frenkel nachgewiesen (18), der auf diesem Weg Immunität gegen sonst tödliche Virusinfektionen übertragen konnte.

2. In vitro Versuche

2.1. Direkte Immunfluoreszenz

Mit der direkten Immunfluoreszenz sollte der quantitative Anteil der B-Lymphozyten in den lymphatischen Organen und im Blut tumortragender splenektomierter und scheinoperierter Hamster bestimmt werden. Es konnten keine Unterschiede zwischen den Versuchstieren und den Kontrollen beobachtet werden. Auch innerhalb der Gruppen finden sich zwischen den tumordrainierenden und kontralateralen Lymphknoten keine Unterschiede (Tab. 16).

Da die Bestimmungen - bis auf die Untersuchung der Milz der splenektomierten Hamster - jeweils am Versuchsende durchgeführt wurden, muß gefolgert werden, daß es im fortgeschrittenen Tumorstadium nicht zu einer Verschiebung des B-Zellanteils in den einzelnen lymphatischen Organen kommt. Er entspricht dem B-Zellanteil gesunder Hamster, wie er von anderen Untersuchern ermittelt wurde (Tab. 22).

Tab.22: Anteil von B-Lymphozyten in den lymphatischen Organen des Hamsters

	% B-Zellen in			
	Milz	Thymus	Lymphknoten	Blut
Aftab (1)	44	5	30	26
Hart (28)	39 $\pm$ 7	2 $\pm$ 1	24 $\pm$ 7	--
Streilein (61)	36	2	25	10

2.2. Leukozyten-Adhärenz-Inhibitionstest

In vitro wurde die Adhärenzfähigkeit an Glasoberflächen von Milzlymphozyten und Leukozyten aus dem Blut tumortragender Hamster untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die Zellen nach Tumorantigenexposition ihre Fähigkeit zur Adhärenz verlieren (Tab. 23).

Der Leukozyten-Adhärenz-Inhibitionstest wurde in einem Mäusemodell von Holt (35) mit anderen etablierten in vitro-Methoden verglichen. Er untersuchte den Mikrozytotoxizitäts-Test, den Lymphotoxintest, den Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test und Lymphozyten-Stimulationsteste. Diese Methoden dienen alle zum Nachweis zellulärer Immunität. Holt fand eine gute Korrelation der LAI-Befunde mit den anderen Methoden.

Immunisierte Leukozyten, die mit spezifischem Antigen inkubiert werden, produzieren lösliche Bestandteile, die auch die Adhärenzfähigkeit nichtimmunisierter Leukozyten blockieren können. Hierbei könnte es sich um Lymphokine handeln, wie Halliday (27) vermutet, der mit Hilfe des LAI bei CBA-Mäusen zelluläre Immunität gegen chemisch induzierte Sarkome nachweisen konnte.

Grosser (25) untersuchte mit dem LAI die zellgebundene Antitumorimmunität von menschlichen Adenokarzinomen der Brust. Zu einer positiven Reaktion kam es nur bei Leukozyten von Karzinompatientinnen, während die Zellen von Patienten mit histologisch gutartigen Erkrankungen der Brust nicht reagierten.

Beim Hamster konnte in vorliegenden Untersuchungen in zwei Ansätzen, mit der Zählkammermethode und der Röhrchenmethode, wie Holan (34) sie im Rattenmodell etablierte, eine positive Reaktion gefunden werden. Daraus kann geschlossen werden, daß Hamster nach A-Mel 3-Inokulation zellgebundene Immunität entwickeln, und daß als Voraussetzung dafür das A-Mel 3 Melanom immunogen ist.

		Zählkammermethode % adhärenter Zellen	Röhrchenmethode % nichtadhärenter Zellen
A-Mel 3 Hamster	Milz- Lymphozyten		
	+ Tu-Antigen	32,4±21,9	35,0±16,8
	+ PBS	64,0±18,7	14,7±15,4
	Leuko- zyten		
	+ Tu-Antigen	28,8±18,9	55,5±22,9
	+ PBS	53,0±23,4	35,4±13,6
Kontroll- Tiere	Milz- Lymphozyten		
	+ Tu-Antigen	48,8±33,3	33,5±25,2
	+ PBS	61,2±29,0	23,7±21,6
	Leuko- zyten		
	+ Tu-Antigen	49,0±23,1	41,2±23,9
	+ PBS	55,0±20,3	32,6±19,1

Tab. 23: Zusammenfassung der Ergebnisse des Leukozyten-Adhärenz-Inhibitionstest

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Im Hamstermodell beträgt die Tumorzinzidenz des amelanotischen Melanoms A-Mel 3 100 %. Der Zeitpunkt des klinischen Manifestwerdens des Tumors hängt von der inokulierten Tumorzellzahl ab.
2. Splenektomie führt bei hoher initialer Tumorbelaſtung zu einem tumorprotektiven Effekt: Die Melanome erscheinen ſpäter. Das finale Tumorgewicht iſt niedriger.
3. Bei niedriger initialer Tumorbelaſtung hat Splenektomie keinen Einfluß auf das Tumorzwaſtum. Auch die Variation des Intervalls Splenektomie-Tumorzinokulation verändert die Immunantwort nicht.
4. Der Transfer von Lymphozyten, die 5 Tage nach Tumorexpoſition gewonnen wurden, führt zu einem früheren Erſcheinen der Tumoren. Dieſer ſuppreſſive Effekt iſt vor und nach dem 5. Tag nicht nachweisbar.
5. Der quantitative B-Zellenanteil in den lymphatiſchen Organen tumortragender ſplenektomierter Hamſter unterſcheidet ſich im fortgeſchrittenen Tumorztaſium nicht von dem nichtſplenektomierter melanomtragender Tiere und entſpricht dem geſunder Hamſter.
6. In vitro gelingt der Nachweis ſpezifisch gegen den Tumor immunisierter Lymphozyten, d.h. das A-Mel 3-Melanom iſt immunogen und es kommt zu einer Immunantwort der Hamſter gegen das Melanom.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- | | | |
|---|--|---|
| 1 | AFTAB, A.
HARE, J.A.
SELL, W.S. | Morphological and functional characteristics of lymphoid cells from LHC hamsters.
Federation Proceedings 37,7:2045 (1978) |
| 2 | ARGYRIS, B.F. | Activation of suppressor cells by syngeneic tumor transplants in mice.
Cancer Res. 38:1269 (1978) |
| 3 | BALDWIN, R.W. | Tumor-specific antigens associated with chemically induced tumors.
Rev. Eur.Etud.Clin.Biol.15:593 (1970) |
| 4 | BALDWIN, R.W.
PRICE, M.R.
ROBINS, R.A. | Blocking of lymphocyte-mediated cytotoxicity for rat hepatoma cells by tumour-specific antigen-antibody complexes.
Nature (New Biol.) 238:185 (1972) |
| 5 | BARD, D.S.
PILCH, Y.H. | The Role of the Spleen in the Immunity to a chemically Induced Sarcoma in C3H Mice.
Cancer Res. 29:1125-1131 (1969) |
| 6 | BASTEN, A.
MILLER, J.F.A.
SPRENT, J.
CHEERS, C. | Cell to cell interaction in the immune response, X. T-cell dependent suppression in tolerant mice.
J. exp. Med. 140:199 (1974) |
| 7 | BURNET, F.M. | The concept of immunological surveillance.
Prog. Exp. Tumor Res. 13:1 (1970) |

- 8 CANTOR, H.
BOYSE, E.A. Functional subclasses of T-Lymphocytes bearing different Ly-antigens. II. Cooperation between subclasses of Ly-cells in the generation of killer activity. J. exp. Med. 141:1390 (1975)
- 9 CHANG, R.W.S.
TURK, J.L. Increased Resistance in Splenectomized Mice to a Methylcholantrene-Induced Tumour. Brit. J. Cancer 35:768 (1977)
- 10 DENNERT, G. Thymus-derived killer-cells: Specificity of function and antigen recognition. Transpl. Rev. 29:59 (1976)
- 11 DUTTON, R.W. Suppressor T-cells Transpl. Rev. 26:39 (1975)
- 12 FENYO, E.M.
KLEIN, E.
KLEIN, G.
SWEICH, K. Selection of an immunoresistant Moloney lymphoma subline with decreased concentration of tumor-specific surface antigens. J. Natl. Cancer Inst. 40:69 (1968)
- 13 FERRER, J.F. Enhancement of the Growth of Sarcoma 180 in splenectomized and shamoperated AKR mice. Transplantation 6.2:160 (1968)
- 14 FERRER, J.F. Role of the Spleen in Passive Immunological Enhancement. Transplantation 6.2.:167 (1968)

- 15 FIGHTLIN, R.S. Splenic Regulation of Lymphocyte Trapping
LYTTON, B. in Lymph Nodes Draining Tumor Grafts.
GERSHON, R.K. J. Immunol. 115,2:345 (1975)
- 16 FOLCH, H. The splenic suppressor cell. II.
WAKSMAN, B.H. Suppression of the mixed lymphocyte
reaction by thymus dependent adherent
cells.
J. Immunol. 113:140 (1974)
- 17 FORTNER, J.G. Hitherto Unreported Malignant Melanomas
ALLEN, A.C. in the Syrian Hamster: An Experimental
Counterpart of the Human Malignant
Melanomas.
Cancer Research 18:98 (1958)
- 18 FRENKEL, J.K. Immune responses to nonviral intracel-
lular infections of hamsters.
Federation Proceedings 37,7:2063 (1978)
- 19 FUJIMOTO, S. Immunosuppressor T-cells in tumor
GREENE, M. bearing hosts.
SEHON, A.H. Immunol. Comm. 4:201 (1975)
- 20 FUJIMOTO, S. Regulations of the immune response to
GREENE, M. tumor antigens. II. The nature of
SEHON, A.H. immuno-suppressor cells in tumor
bearing hosts.
J. Immunol. 116:800 (1976)
- 21 GATTI, R.A. Occurrence of malignancy in immuno-
GOOD, R.A. deficiency diseases: A literature review.
Cancer 28:89 (1971)

- 22 GERSHON, R.K. A disquisition on suppressor T cells.
Transplant. Rev. 26:170 (1975)
- 23 GERSHON, R.K. Immunoregulatory role of spleen
LANCE, E.M. localizing thymocytes.
KONDO, K. J. Immunol. 112:546 (1974)
- 24 GORCZYNSKI, R.M. Immunity to Murine Sarcoma Virus-Induced
Tumors.II Suppression of T Cell-mediated
Immunity by Cells from Progressor Animals.
J. Immunol. 112,5:1826 (1974)
- 25 GROSSER, N. Cell-mediated Antitumour Immunity in
THOMSON, D.M.P. Breast Cancer Patients Evaluated by
Antigen-induced Leukocyte Adherence
Inhibition in Test Tubes.
Cancer Res. 35:2571 (1975)
- 26 HALLIDAY, W.J. Detection of Anti-Tumour Cell Mediated
MALUISH, A. Immunity and Serum Blocking Factors
ISBISTER, W. in Cancer Patients by the Leucocyte
Adherence Inhibition Test.
Brit. J. Cancer 29:31 (1974)
- 27 HALLIDAY, W.J. Leukocyte Adherence Inhibition:
MILLER, S. A simple test for cell-mediated tumour
immunity and serum blocking factors.
Int. J. Cancer 9:477 (1972)
- 28 HART, A.D. Mitogenic activation of hamster
STEIN STREILEIN, J. lymphoid cells.
EIDELS, L. Federation Proceedings 37,7:2039 (1978)

- 29 HATTLER, B. The immunology of cancer: Tumor
AMOS, B. antigens and the responsiveness of the
host.
Mongr. Surg. Sci. 3,1 (1966)
- 30 HELLSTRÖM, K.E. Lymphocyte-mediated cytotoxicity and
HELLSTRÖM, I. blocking serum activity to tumor
antigens.
Adv. Immunol. 18:209 (1974)
- 31 HELLSTRÖM, K.E. Clinical Immunobiology
HELLSTRÖM, I. Vol. II 233-264 (1974)
Academic Press, Inc., New York
- 32 HELLSTRÖM, I. Serum mediated inhibition of
HELLSTRÖM, E. cellular immunity to methylcholantrene
SJÖGREN, H. induced sarcomas.
Cellular Immunol. 1:18 (1970)
- 33 HILDEMAN, W.H. The Syrian Hamster in immunologic
perspective.
Federation Proceedings 37,7:2102 (1978)
- 34 HOLAN, V. Antigen-Mediated Macrophage Adherence
HASEK, M. Inhibition.
BUBENIK, J. Cellular Immunol: 13:107 (1974)
CHUTNA, J.
- 35 HOLT, P.G. Evaluation of the Microplate
FIMMEL, P.I. Leukocyte Adherence Inhibition Test
FINLAY-JONES, L.M. and Its Reproducibility, Sensivity,
FLOWER, R.L. and Relationship to other Tests
of Cellular Immunity.
Cancer Res. 39:564 (1979)

- 36 ISAKOV, N. An immunoregulatory factor associated
SEGAL, S. with spleen cells from tumorbearing
HOLLANDER, N. animals. I. Effect on tumor growth and
FELDMAN, M. antibody production.
Int. J. Cancer 22:465 (1978)
- 37 KALISS, N. Immunological enhancement of tumour
homografts in mice: A review.
Cancer Res. 18:992 (1958)
- 38 KALISS, N. Immunological enhancement
Int. Rev. Exp. Pathol. 8:241 (1969)
- 39 KALISS, N. Dynamics of immunologic enhancement
Transplantation Proc. 2:59 (1970)
- 40 LAUSE, D.B. Lymphoid cell interactions in allograft
STREILEIN, J.W. immunity. Failure of Hamsters to generate
Suppressor Cells upon specific immuni-
zation.
Transplantation 26,2:80
- 41 LEWIN, H. Über die Wirkung der Milzexstirpation
GERICKE, O. auf das Wachstum transplantabler
Rattentumoren.
Naturwissenschaften 61 (1974)
- 42 MAN-SUN, S. A splenic requirement for the generation
MILLER, S.D. of suppressor T cells.
KOWACH, H.B. J. Immunol. 119,6 (1977)
CLAMAN, H.N.
- 43 MC KHANN, C.F. Primary malignancy in patients under-
going immunosuppression for renal
transplantation.
Transplantation 8:209 (1969)

- 44 MÖLLER, E. Interaction between tumor and host during progressive neoplastic growth in histoincompatible recipients. J. Natl. Cancer Inst. 35:1035 (1965)
- 45 NACHTIGAL, D. The role of specific suppressor
ZAN-BAR, J. T-cells in immune tolerance.
FELDMAN, M. Transplant. Rev. 26:87 (1975)
- 46 NORDLUND, J.J. Splenic regulation of the clinical
GERSHON, R.K. appearance of small tumors.
J. Immunol. 114:1486 (1975)
- 47 OLD, L.J. Immunology of experimental tumors
BOYSE, E.A. Annu. Rev. Med. 15:167 (1964)
- 48 OLD, L.J. Effect of prior splenectomy on the
CLARKE, D.A. growth of sarcoma 180 in normal and
BENACERRAF, B. BGG infected mice.
STOCKERT, E. Experientia 18:355 (1962)
- 49 ORITA, K. Effect of Splenectomy in Tumor-Bearing
KONAGA, E. Mice and Gastric Cancer Patients.
OKADA, T. Gann 68:731 (1977)
KUNISADA, K.
YUMURA, M.
TANAKA, S.
- 50 PIERCE, L.W. The effects of endotoxin on the
immune response in rat. II. Antibodies
formed against bovine γ -globulin
in the splenectomized rat.
Lab. Invest. 16:782 (1967)

- 51 POLLACK, S. Effect of host sex and splenectomy on Moloney virus-induced sarcomas. Int. J. Cancer 8:264 (1971)
- 52 POPE, B.L. Two Distinct Population of Suppressor
WHITNEY, R.B. Cells in the Spleens of Mice Bearing
LEVY, J.G. Methylcholantrene-induced Tumors.
J. Immunol. 120,6:2033 (1978)
- 53 PREHN, R.T. Immunosurveillance, regeneration and
oncogenesis.
Prog. Exp.Tumor Res. 14:1 (1970)
- 54 RICH, R.R. Biological expression of lymphocyte
PIERCE, L.W. activation. III. Suppression of
plaque-forming cell responses in vitro
by supernatant fluids from concana-
valin A activated spleen cell cultures.
J. Immunol. 112:1360 (1974)
- 55 ROSENBERG, J.C. The malignant Melanomas of Hamsters
ASSIMACOUPOULOS, C. I. Pathologic Characteristics of a
LOBER, P. Transplanted Melanotic and Amelanotic
ROSENBERG, S.A. Tumor.
ZIMMERMANN, B. Cancer Res. 21,1:627 (1961)
- 56 ROWLEY, D.A. The effect of splenectomy on the
formation of circulating antibody in
adult male albino rat.
J. Immunol. 120:1054 (1978)
- 57 SELL, S. Immunologie, Immunpathologie und
Immunität S. 316 (1977)

- 58 SJÖGREN, H.O. Studies on specific transplantation resistance to polyoma-virus-induced tumors.IV. Stability of the polyoma cellantigen.
J. Natl. Cancer Inst. 32:661 (1964)
- 59 SJÖGREN, H.O.
HELLSTRÖM, I.
BANSAL, S.C.
HELLSTRÖM, K.E. Suggestive evidence that the "Blocking antibodies" of tumor-bearing individuals may be antigen-antibody complexes.
Proc. Nat. Acad.Sci. USA 68.6:1372 (1971)
- 60 SMITH, R.T. Tumor specific immune mechanisms
New England J. Med. 278:1027 (1968)
- 61 STREILEIN, J.W. In Syrian hamster lymphoid tissue: evidence for a restricted B cell mass.
Federation Proceedings 37,7:2107 (1978)
- 62 TREVES, A.J.
COHEN, J.R.
FELDMAN, M. A syngeneic metastatic tumor model in mice: The natural immune response of the host and its manipulation.
Israel J. med. Sci. 12:369 (1976)
- 63 WHITNEY, R.B.
POPE, B.L.
LEVY, J.G. Immune Competence and Immunosuppressive Factors in Splenectomized Tumor-bearing Mice.
Cellular Immunol. 28: 15 (1977)
- 64 WITTING, C.
HULTSCH, E. Effect of Splenectomy on B- and T-Lymphocytes and a Benzpyrene-Induced Murine Sarcoma.
Z. Krebsforschung 92:267 (1978)

DANKSAGUNG

Herrn Prof Dr. med. Dr.h.c.W. Brendel danke ich für die Überlassung des Themas, die Verfügungstellung eines Arbeitsplatzes am Institut für Chirurgische Forschung und die freundliche Betreuung.

Besonders danke ich Herrn Prof. Dr.med. Dr.med.vet.C. Hammer für die Unterstützung bei den Experimenten und zahlreiche Ratschläge.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen des Instituts, besonders Frl. E. Doischer, Frl. H. Bayer und Frl. A. Allmeling danke ich für ihre tätige Mithilfe bei der Durchführung der Versuche.

Frl. H. Bayer und Frl. G. Höbel danke ich für ihre Hilfe beim Fertigstellen der Abbildungen.

Für die sorgfältige Betreuung der Versuchstiere danke ich den Tierpflegern.

L e b e n s l a u f

Hans Peter Mainusch geb. am 08.11.1955 in Murnau als Sohn
des Bäckermeisters Robert Mainusch und
seiner Ehefrau Ella, geb. Büchsler

Schulbildung: Volksschule in Peissenberg/Oberbayern:
1961-1965
Gymnasium, mathematisch-naturwissen-
schaftlicher Zweig in Weilheim:
1965-1974
Abitur: 1974

Studium: Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München:
1974-1981
Approbation als Arzt: 13.05.1981
Doktorand am Institut für Chirurg.
Forschung der
Ludwig-Maximilians-Universität München
(Leiter: Prof. Dr. Dr. W. BRENDDEL):
1977-1981

Eheschließung: am 16.09.1983 mit Yvonne K.H. Liem

Militärdienst: vom 01.08.1981 bis 31.07.1983 Assistent
an der Allgemeinchirurgischen Abteilung
des Bundeswehrzentrankrankenhauses in
Koblenz (Leiter: Priv.- Doz. Dr. med.
habil. J. LENZ)

 vom 1.8.1983 - 30.06.1984 Assistent an
der Abteilung für Unfallchirurgie und
Verbrennungsmedizin des
Bundeswehrzentrankrankenhauses in
Koblenz (Leiter: Dr. med. H.L. KLAMMER)

 Seit 1.7.1984 Assistent an der
Chirurgischen Abteilung des Städtischen
Krankenhaus Landshut (Leiter Prof. Dr.
med. HUECK)

